VerifyNow® IIb/IIIa
PLATELET REACTIVITY TEST

Accumetrics®

INSTRUCTIONS FOR USE

(English)
(Français)
(Italiano)
(Deutsch)
(Español)

Technical Support
(US) +1 858 643 1600
support@accumetrics.com

INTENDED USE

The VerifyNow IIb/IIIa Test is a semi-quantitative, whole blood platelet function test used to measure glycoprotein (GP) IIb/IIIa receptor blockade in patients treated with abciximab or eptifibatide. VerifyNow IIb/IIIa Test results should be interpreted in conjunction with other clinical and laboratory data available to the clinician.

For in vitro diagnostic use.

SUMMARY AND EXPLANATION

The VerifyNow System is a turbidimetric based optical detection system, which measures platelet-induced aggregation. The system consists of an instrument, a disposable test device and quality control materials. See **Figure 1** for a representation of the test device. Quality control measures include an instrument based electronic quality control (EQC), two levels of wet quality controls (WQC), internal quality controls, and shipping controls. The instrument controls all assay test sequencing, temperature, reagent sample mixing and performs self-diagnostics. The degree of platelet function is determined and the result is displayed.

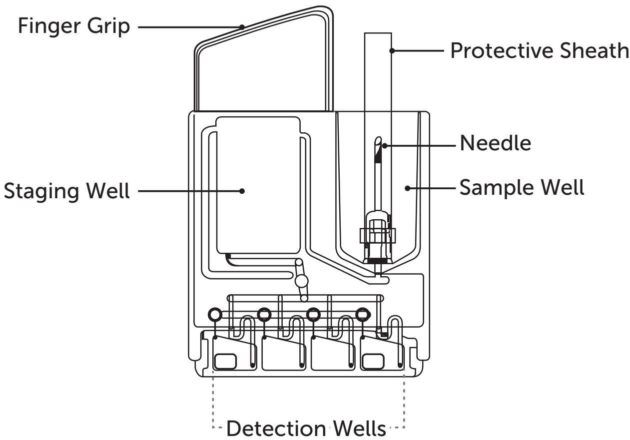


Figure 1: Test Device

Each single use test device contains a lyophilized preparation of human fibrinogen coated beads, thrombin receptor activating peptide (iso TRAP), and buffer. The patient sample is anticoagulated whole blood, which is automatically dispensed from the blood collection tube into the test device by the instrument, with no blood handling required by the user.

PRINCIPLE OF THE TEST

The VerifyNow IIb/IIIa Test is designed to assess platelet function based upon the ability of activated platelets to bind fibrinogen. Fibrinogen-coated microparticles aggregate in whole blood in proportion to the number of unblocked platelet GPIIb/IIIa receptors. The rate of microbead aggregation is more rapid and reproducible if platelets are activated; therefore the reagent iso-TRAP is incorporated into the test to induce platelet activation without fibrin formation. Light transmittance increases as activated platelets bind and aggregate fibrinogen-coated beads. The instrument measures this change in optical signal and reports results in Platelet Aggregation Units (PAU).

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For in vitro diagnostic use.

The VerifyNow Instrument and its components should only be used as directed in the User Manual.

Do not use the VerifyNow IIb/IIIa Test device or WQC materials beyond the expiration date.

All patient samples should be handled as if capable of transmitting disease.

The reagents are manufactured with a material purified from human plasma that was found negative for all communicable diseases tested, including HIV-1, HIV-2, Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and HCV. Handle test devices as biohazardous material and dispose of in an appropriate manner.

Do not attempt to remove the blood collection (or WQC) tube from the test device after it has been inserted onto the needle in the test device.

REAGENT STORAGE AND HANDLING

Test Device Kit Indicator: Each VerifyNow Test kit has a temperature indicator on the outside of the packaging. The user is instructed to inspect the indicator upon receipt of the kit. If the indicator has changed color, the kit has been exposed to elevated temperature, and a Wet Quality Control (WQC) Level 2 must be run to ensure that the reagents are performing properly. The Temperature Indicator detects errors due to adverse environmental conditions.

For extended storage, maintain test devices at 2° to 8°C. Alternatively, these test devices may be stored for up to 8 weeks at room temperature (18° to 25°C) or (64° to 77°F), but not beyond the expiration date printed on the pouch. When removed from refrigeration, write the date to discard on the pouches and/or kit box.

Allow test devices to reach room temperature prior to use.

Test devices should remain sealed in the foil pouches until ready for use to prevent damage by humidity.

Test devices are stable until the expiration date printed on the outer box.

SAMPLE COLLECTION PROCEDURE

Instructions for Blood Collection Tube Selection for All Samples

Samples must be collected into the appropriate sample tube and anticoagulant according to the table below. Samples collected from patients who are receiving eptifibatide (Integrilin) must only be collected into tubes containing lithium heparin.

Greiner 454322 (2 mL citrate tube)	Greiner 454323 (high altitude 2mL citrate tube)	Greiner 454244 (3 mL lithium heparin tube)

Table 1: Blood Collection Tubes

Instructions for Sample Collection from Indwelling Venous Catheters:

Note: Do not use an Intravenous Catheter

1. Whole blood samples that are obtained from an indwelling catheter should be collected after sufficient discard (approximately 5 mL) has been drawn to clear the line. Ensure indwelling catheter is free of clots. **Transfer blood to the blood collection tube immediately after collection.**

Note: If blood is to be transferred using a needle, the size must be 21 gauge or larger (e.g. 18-20 gauge).

2. Gently invert the sample tube **5 times** to ensure complete mixing of the contents.
3. Test the sample within 15 minutes of collection as instructed in the Test Procedure.
4. Blood drawn during the insertion of an IV catheter should not be used.

Instructions for Peripheral Samples:

1. Whole blood may be collected from venous sites using a 21 gauge or larger (e.g. 18-20 gauge) needle in an appropriate blood collection tube. Blood samples should be obtained from an extremity free of peripheral venous infusions.
2. Collect a discard tube first (approximately 2 mL). The discard tube must not contain EDTA.
3. Gently invert the sample tube at least 5 times to ensure complete mixing of the contents.
4. Test the sample within 15 minutes of collection as instructed in the Test Procedure.
5. Blood drawn during the insertion of an IV catheter should not be used.

SAMPLE COLLECTION PRECAUTIONS

- Improper blood collection techniques may cause an Attention message. Refer to the VerifyNow System User Manual for a more detailed explanation of this message.
- Use only 21 gauge or larger bore needles for blood collection or transfer.
- Blood samples should be kept upright prior to testing and avoid prolonged contact with the rubber stopper on the blood collection tube.
- Avoid use of a rocker or pneumatic tube transport system.
- Collection of the blood sample must be performed with care to avoid hemolysis or contamination by tissue factors. Samples with evidence of clotting should not be used.
- The first collection tube must be discarded (approximately 2 mL).
- If drawing blood for a CBC at the same time as sample collection for VerifyNow IIb/IIIa Test, draw the VerifyNow sample first. Fill the CBC tube after the VerifyNow sample tube.
- Fresh whole blood samples must be used within 15 minutes of collection.
- Always ensure blood collection tubes are filled to the indicated fill volumes. At altitudes greater than 2500 feet above sea level, blood collection tubes may not fill to the specified volume, which results in an incorrect ration of blood to anticoagulant. Users at these altitudes should refer to their facility's blood collection protocols or blood collection tube manufacturer's recommendations for instructions to properly fill blood collection tubes.
- Do not freeze or refrigerate blood samples.
- All patient samples should be handled as if capable of transmitting disease.
- Universal precautions should be followed.

TEST PROCEDURE

1. Select the type of sample that will be tested: VerifyNow WQC or a patient blood sample.
2. Open the foil pouch and remove the test device. Test devices should only be handled by finger grip (**See Figure 1**).
3. Remove the needle's protective sheath by pulling directly up on the sheath. Do not twist the sheath as this may remove the needle.
4. At the instrument prompt, insert the test device into the instrument.
5. At the instrument prompt, invert the sample tube 5 times, and insert onto the needle in the test device. Close the test port cover.
6. The instrument will run the test and display the result.

CAUTION	**The sample is under pressure. Do not remove the sample tube from the test device.**

7. Remove the test device by grasping the test device finger grip and pulling straight up. Do not remove the tube from the test device. Dispose of the entire test device/ sample tube in appropriate biohazard waste container.

Refer to the VerifyNow System User Manual for complete operating instructions.

MATERIALS PROVIDED

10 VerifyNow IIb/IIIa Test devices (Catalog # 85310) individually sealed in foil pouches. Each test device contains lyophilized fibrinogen-coated beads, iso-TRAP, bovine serum albumin, and buffer.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- VerifyNow System (Catalog #86000)
- VerifyNow WQC Kit (Catalog #85047)
- Blood collection tubes listed in **Table 1**.

Note: Sodium citrate should not be used as an anticoagulant when measuring samples from patients treated with eptifibatide.

QUALITY CONTROL

Instrument electronic controls

- To ensure instrument performance, the manufacturer recommends that an Electronic Quality Control (EQC) be run once each day of patient testing. This reusable device verifies instrument optics, pneumatics and mixing. Refer to the Quality Control section of the VerifyNow System User Manual for instructions on running EQC.
- The instrument automatically verifies sample filling, correct fluid transfer, and mixing. The instrument also monitors the electronic and mechanical components.

Test device controls

The VerifyNow IIb/IIIa Test contains the following internal control:

- **Negative control:** Each test device includes internal controls to determine whether the VerifyNow IIb/IIIa Test result is valid and causes the instrument to report an error message for an invalid test. The negative internal control test is performed during the first five seconds of the assay, before platelet activation and binding to the fibrinogen-coated beads occurs.

Wet Quality Control

VerifyNow WQC Level 1 and Level 2 are formulated at clinically relevant levels and can be used as part of a laboratory quality control program. The VerifyNow WQC Level 1 and Level 2 acceptable ranges are printed on the test device pouch.

The manufacturer recommends that a Level 2 WQC be run once each time a new lot or a new shipment of VerifyNow IIb/IIIa Test kits is received. VerifyNow WQC (Catalog #85047) is available from the manufacturer. For more information, refer to the WQC package insert.

Call Accumetrics Technical Support for questions regarding WQC materials.

TROUBLESHOOTING

Under certain conditions, the instrument may display an Error or Alarm message. Refer to the VerifyNow System User Manual for a more detailed explanation of these messages. For additional troubleshooting, contact Accumetrics Technical Support at: (telephone) +1 (858) 643-1600; (e-mail) support@accumetrics.com.

CALIBRATION

VerifyNow IIb/IIIa Test devices are calibrated at the factory. This calibration information is contained in the barcode located on each test device, and is automatically read by the instrument.

INTERPRETATION OF RESULTS

The VerifyNow IIb/IIIa Test reports patient results in Platelet Aggregation Units (PAU), which are calculated as a function of the rate and extent of aggregation. The VerifyNow instrument also allows the user to calculate the percent inhibition for a given patient provided that a baseline PAU value was obtained prior to administration of drug. The use of GP IIb/IIIa inhibitors such as abciximab and eptifibatide has been shown to be useful as an antithrombotic strategy.[1] In patients receiving abciximab or eptifibatide and in animal models of coronary thrombosis with abciximab, the ex vivo platelet aggregation response was virtually abolished when GPIIb/IIIa blockade was maintained at steady state >80%.[2,3] Further study has shown that with all GPIIb/IIIa inhibitors, including abciximab and eptifibatide, platelet function inhibition >95% at 10 minutes after the start of therapy was associated with a significant decrease in the incidence of a major adverse cardiac event.[4]

Reference Ranges

The VerifyNow IIb/IIIa Test was performed in clinical studies at 9 centers on patients undergoing percutaneous coronary intervention. Testing was performed on samples from 173 patients with planned treatment with abciximab (173 baseline and 173 post abciximab) and 114 patients with planned treatment with eptifibatide (114 baseline and 97 post eptifibatide). **Table 2** presents the mean PAU values at Baseline (prior to abciximab or eptifibatide administration), >80% and >95% inhibition.

	Abciximab			Eptifibatide		
PAU	**Baseline**	**≥80%**	**≥95%**	**Baseline**	**≥80%**	**≥95%**
n	173	173	130	114	97	50
Mean	224	9	2	199	11	3
SD	54	20	4	40.6	9.4	3
Reference Range	125-330	0-44	0-13	136-288	0-31	0-10

Table 2: Reference Ranges

LIMITATIONS

Delays in testing or difficulty of specimen collection may result in spurious values.

The lyophilized reagent is hygroscopic and can degrade after prolonged exposure to room air. Therefore, the test device should be used shortly after removal from the foil pouch.

When results are not within the expected limits, the possibility of improper sample collection or handling should be investigated. Repeat the test using a new test device and sample. Patients with inherited platelet disorders such as von Willebrand Factor Deficiency, Glanzmann Thrombasthenia and Bernard-Soulier Syndrome have not been studied with the VerifyNow IIb/IIIa Test. The VerifyNow IIb/IIIa Test is not intended for use with these types of platelet disorders. Patients with a known history of platelet counts <100 x109/L have not been studied. The VerifyNow IIb/IIIa Test has not been compared to platelet aggregometry in patients with a 30% decrease in PRP platelet count. VerifyNow IIb/IIIa Test results should be interpreted in conjunction with other clinical and laboratory data available to the clinician.

Reference ranges were calculated using CLSI guidelines. The following demographic characteristics were considered: gender, ethnicity, current smoker, and previous abciximab use. The mean baseline PAU was consistent across all groups, and no statistically significant bias was demonstrated in any of the demographic variables tested. An analysis of the clinical data and the associated demographic information showed that there was no need to create separate reference ranges based upon demographic variables. As has been shown, there is no overlap between the baseline and inhibition reference ranges, which provides the clinician with an unambiguous interpretation.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Studies evaluating the VerifyNow IIb/IIIa Test in patients treated with abciximab compared the VerifyNow IIb/IIIa Test to a 125 I-abciximab Receptor Blockade Assay (RBA) which quantitates the molecules bound per platelet and platelet aggregometry using a CHRONO-LOG Optical Aggregometer with 20 µM ADP as the agonist to detect the maximal slope over a five minute period. The unit of measure for the VerifyNow IIb/IIIa Test is PAU and is based upon both the rate and extent of platelet and fibrinogen coated beads binding over a defined period.

Studies evaluating the VerifyNow IIb/IIIa Test in patients treated with eptifibatide compared the VerifyNow IIb/IIIa Test to the same platelet aggregometry test described above and a platelet flow cytometric test measured as mean fluorescence units.

The clinical trials were designed to obtain samples at three time points: 1) Baseline, prior to abciximab or eptifibatide administration; 2) During Infusion, within 1 hour following bolus administration and 3) Post Infusion, 24 hours after bolus or at the time of discharge, whichever occurred first, to assess recovery of platelet function. For each patient, a baseline, during infusion and post infusion (24-hour) sample was measured by each test method and the results recorded.

Figures 2 and **3** show the time course of platelet inhibition for the three methods as individual points and mean +/- standard deviation, respectively, and illustrate the agreement of the three methods. (See **Figures 2** and **3**)

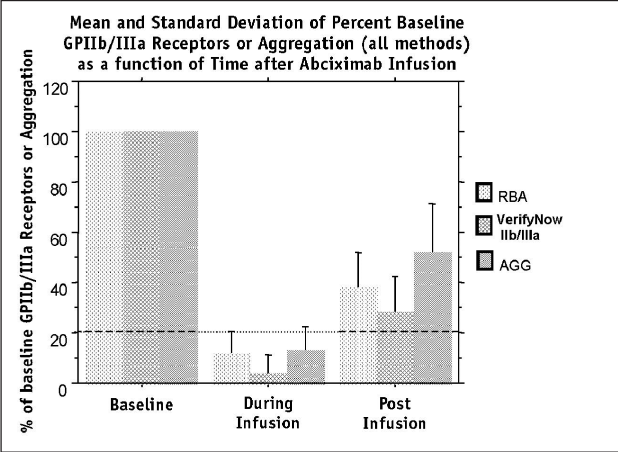


Figure 2: Mean and Standard Deviationof Percent Baseline GPiib/IIIa or Aggregation (all methods) as a function of Time after Abciximab Infusion

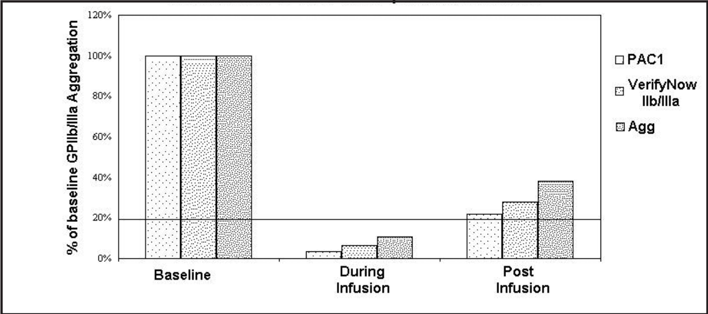


Figure 3: Mean Percent Baseline GPIIb/IIIa Aggregation (all methods) as a function of Time after Eptifibatide Infusion

Method Correlation

Correlation between methods was assessed by regression analysis based on data from patients treated with abciximab and eptifibatide. The data was analyzed to determine the correlation of the VerifyNow IIb/IIIa Test with RBA and platelet aggregometry in abciximab treated patients and with PAC1 Flow Cytometry and platelet aggregometry in eptifibatide treated patients. Data points for the clinical analysis were reported in raw units for each test: PAU for the VerifyNow IIb/IIIa Test; slope for aggregometry; molecules per platelet bound for RBA; and mean fluorescence for PAC1 Flow Cytometry. (See **Figures 4, 5, 6 and 7**)

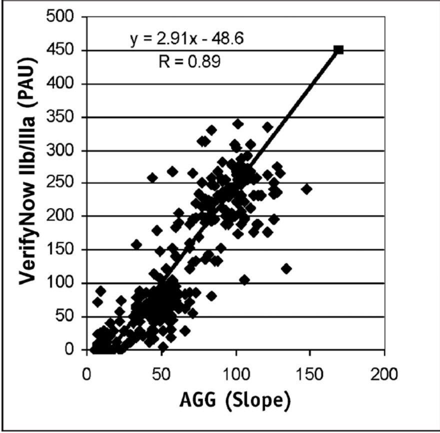


Figure 4: Deming Regression VerifyNow IIb/IIIa Test vs Aggregometry

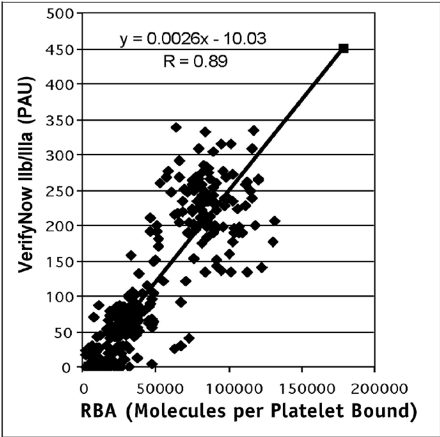


Figure 5: Deming Regression VerifyNow IIb/IIIa Test vs Receptor Blockade

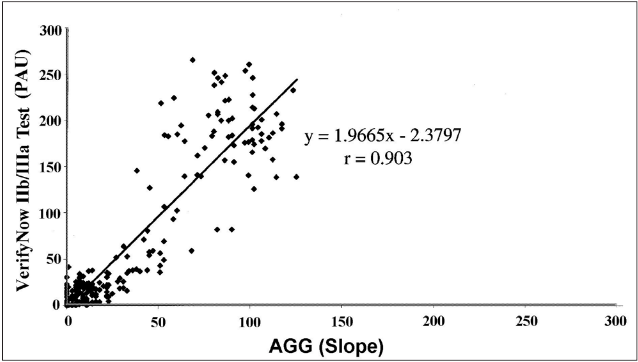


Figure 6: VerifyNow IIb/IIIa Test vs Aggregometry Eptifibatide

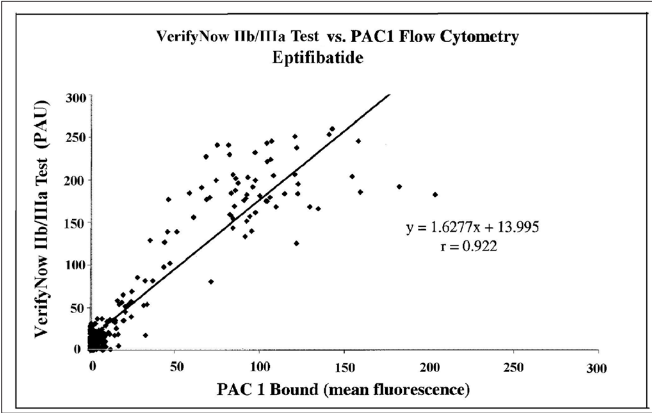


Figure 7: VerifyNow IIb/IIIa Test vs PAC1 Flow Cytometry Eptifibatide

Analytical Sensitivity

The VerifyNow IIb/IIIa Test was run (n=6 per patient) on sixteen patients dosed with abciximab and measured at 10 minutes post bolus dose. The analytical sensitivity of the test was determined to be 8 PAU (2 X SD).

Linearity

Figure 8 shows the linearity of the VerifyNow System. The testing consisted of multiple donors ex-vivo dosed at nine eptifibatide concentrations over multiple days with multiple replicates. The linearity data show that the relationship between eptifibatide concentration and % inhibition is not linear.

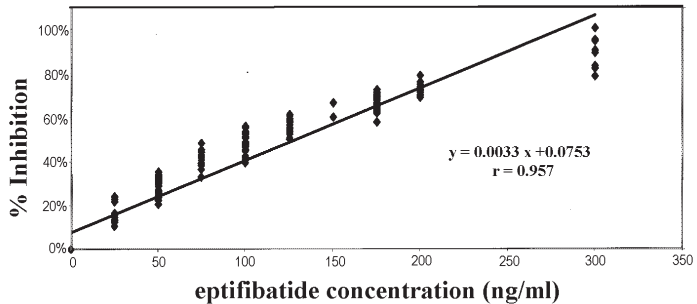


Figure 8: Linearity of VerifyNow System n=29, ex-vivo dosed, multi-day

Precision

Simple and complex precision for both abciximab and eptifibatide were calculated according to CLSI precision guidelines using three lots of VerifyNow IIb/IIIa Test devices and two instruments for abciximab and two lots of test devices and three instruments for eptifibatide. Whole blood was drawn from volunteer donors over 20 days. The within-run CV shown in **Tables 2 and 3** is defined by CLSI as the within-run precision value. (See **Tables 3 and 4**)

Complex Precision Whole Blood				Within-Run (Simple)		Total	
Description	**n (days)**	**n (results)**	**Mean**	**SD**	**CV %**	**SD**	**CV %**
Male Age 32	20	78	147.8	9.2	6.2	13.9	9.4
Male Age 28	20	77	185.3	12.2	6.6	16.0	8.6

Table 3: Complex Precision Statistics (Eptifibatide) as Defined by CLSI

Complex Precision Whole Blood				Within-Run (Simple)		Total	
Description	**n (days)**	**n (results)**	**Mean**	**SD**	**CV %**	**SD**	**CV %**
Female Age 26	20	80	186.3	9.8	5.2	18.7	9.9
Female Age 41	20	80	187.0	9.1	4.9	26.1	13.9
Male Age 29	20	80	244.8	11.1	4.9	25.9	11.5

Table 4: Complex Precision Statistics (Abciximab) as Defined by CLSI

Simple precision was determined for the VerifyNow IIb/IIIa Test wet quality control Level 2. Three lots of test devices were each tested 20 times using a single lot of control. This study was later repeated with a new control lot. The results are shown in **Table 4**. (See **Table 5**)

Lot to lot Cartridge Variation				
Device Lot	**n**	**PAU Mean**	**SD**	**CV***
1	20	202	12	6.0
2	20	180	15	8.3
3	20	176	17	9.9

Table 5: Simple precision

*The manufacturer's specification for the coefficient of variation is <10%.

Interfering Substances

Clinical study data were evaluated to assess the effect of potentially interfering medications on PAU values. Baseline PAU values were compared for patients with and without the following medications present, and no differences were observed: aspirin, ticlopidine, clopidogrel, heparin, warfarin, acetaminophen, NSAIDs, beta-adrenergic blockers, Ca++ channel blockers, statins and nitrates.

Aspirin and heparin were further studied because they are commonly coadministered with GP IIb/IIIa therapy. Varying concentrations of both drugs were evaluated in in-vitro studies, and no significant effect on PAU values was observed. These data are consistent with data reported by Coller using an earlier prototype version of the VerifyNow IIb/IIIa Test.[5]

The effect of platelet counts, hematocrit values and fibrinogen concentration were studied in two clinical trials. Test performance was not affected by platelet count values between 98,000 and 376,000 platelets per microliter, or hematocrit values between 23 and 45%. No test interference was observed when samples with fibrinogen levels between 104 and 617 mg/dL were tested with the VerifyNow IIb/IIIa Test. Moderate lipemia was found to induce an increase in PAU values by 16%.

Another intravenous GP IIb/IIIa inhibitor, tirofiban (Aggrastat®) is approved for use in patients with unstable angina. Patients who have been treated with tirofiban may be sent to the cardiac catheterization lab for PCI. The VerifyNow IIb/IIIa Test can detect platelet inhibition by this drug; therefore VerifyNow IIb/IIIa Test results for these patients should be interpreted with care. A sample taken prior to abciximab (ReoPro®) or eptifibatide (Integrilin®) administration cannot be used to establish a "baseline" or uninhibited result if a GP IIb/IIIa inhibitor was administered within the past 10 days.

VerifyNow® IIb/IIIa
TEST DE RÉACTIVITÉ PLAQUETTAIRE

Accumetrics®

MODE D'EMPLOI

Service technique
(À partir des États-Unis) +1 858 643 1600
support@accumetrics.com

INDICATION

Le test VerifyNow IIb/IIIa est un test semi-quantitatif de la fonction plaquettaire du sang total qui permet de mesurer le degré de blocage des récepteurs de la glycoprotéine (GP) IIb/IIIa chez les patients traités par l'abciximab ou l'eptifibatide. Les résultats du test VerifyNow IIb/IIIa doivent être interprétés en conjonction avec les autres données cliniques et de laboratoire dont dispose le clinicien.

Réservé aux diagnostics in vitro.

SOMMAIRE ET EXPLICATION

Le système VerifyNow est un système de détection optique basé sur la turbidimétrie qui mesure l'agrégation induite par les plaquettes. Le système se compose d'un instrument, d'une cartouche jetable et du matériel de contrôle de la qualité. Voir la **figure 1** pour une illustration de la cartouche. Les mesures du contrôle de la qualité incluent un contrôle de la qualité électronique (EQC) au moyen de l'instrument, des contrôles de la qualité liquide (WQC) à deux concentrations différentes, des contrôles de la qualité internes et des contrôles d'expédition. L'instrument gère l'ensemble de la séquence de dosage, la température, le mélange réactif-échantillon et exécute des autodiagnostics ; il détermine aussi le degré de la fonction plaquettaire et affiche le résultat.

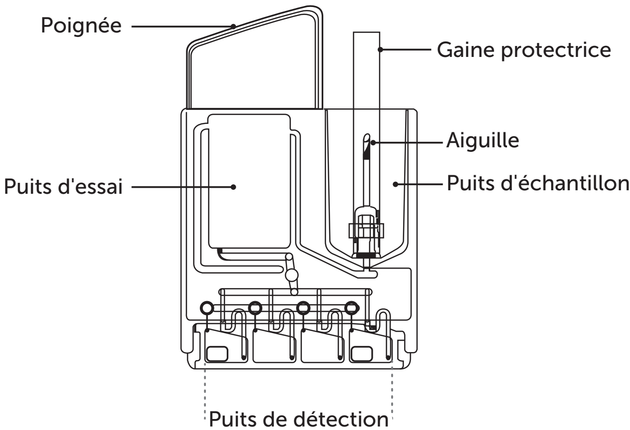


Figure 1 : Cartouche

Chaque cartouche à usage unique contient une préparation lyophilisée de billes recouvertes de fibrinogène humain, le peptide activant le récepteur de la thrombine (iso-TRAP) et un tampon. L'échantillon du patient se présente sous la forme de sang total anticoagulé qui est automatiquement distribué du tube de prélèvement dans la cartouche par l'instrument ; l'utilisateur n'a pas à manipuler le sang.

PRINCIPE DU TEST

Le test VerifyNow IIb/IIIa est conçu pour évaluer la fonction plaquettaire d'après la capacité des plaquettes activées à lier le fibrinogène. Dans le sang total, des microparticules revêtues de fibrinogène s'agrègent en proportion du nombre de récepteurs GP IIb/IIIa plaquettaires non bloqués. La vitesse d'agrégation des microbilles est plus rapide et plus reproductible si les plaquettes sont activées, aussi le réactif iso-TRAP est incorporé dans le test pour induire l'activation plaquettaire sans formation de fibrine. La transmission lumineuse augmente lorsque les plaquettes activées lient et agrègent les billes recouvertes de fibrinogène. L'instrument mesure cette modification du signal optique et exprime les résultats en unités d'agrégation plaquettaire (Platelet Aggregation Units, ou PAU).

AVERTISSEMENTS ET MISES EN GARDE

Réservé aux diagnostics in vitro.

L'instrument VerifyNow et ses composants doivent être utilisés conformément au manuel d'utilisation.

Ne pas utiliser le dispositif de dosage VerifyNow IIb/IIIa ou le matériel WQC au-delà de leur date de péremption.

Tous les échantillons des patients doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des maladies.

Les réactifs sont fabriqués à partir d'une substance purifiée provenant de plasma humain s'étant révélé négatif pour toutes les maladies transmissibles testées, notamment le VIH-1, le VIH-2, l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (HBsAg) et le VHC. Manipuler les cartouches comme une substance biologique dangereuse et les éliminer de la manière qui convient.

Ne pas tenter de retirer le tube de prélèvement sanguin (ou le WQC) de la cartouche une fois qu'il a été enfilé sur son aiguille.

CONSERVATION ET MANIPULATION DES RÉACTIFS

Indicateur du lot de kits de dosage : chaque lot de kits de test VerifyNow contient un indicateur de température situé à l'extérieur du paquet. L'utilisateur est invité à vérifier l'indicateur à la réception du lot. Si l'indicateur a changé de couleur, cela signifie que le lot a été exposé à une température élevée et un contrôle de qualité liquide (WQC) de niveau 2 doit être exécuté pour garantir que les réactifs fonctionnent correctement. L'indicateur de température détecte les erreurs dues à des conditions ambiantes néfastes.

Pour des périodes de conservation prolongées, maintenir les cartouches entre 2 et 8 °C. À défaut, les conserver à température ambiante (entre 18 et 25 °C) pendant 8 semaines maximum, sans dépasser la date de péremption imprimée sur le paquet. Une fois que les cartouches ne sont plus réfrigérées, la date à laquelle elles doivent être mises au rebut doit être inscrite sur les paquets et/ou la boîte du lot.

Laisser les cartouches revenir à température ambiante avant utilisation.

Laisser les cartouches dans leur sachet en aluminium scellé jusqu'à leur utilisation pour éviter qu'elles ne soient exposées à l'humidité.

Les cartouches sont stables jusqu'à la date de péremption imprimée sur la boîte extérieure.

PROCÉDURE DE PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Instructions pour la sélection de tubes de prélèvement sanguin pour tous les échantillons

Les échantillons doivent être prélevés dans le tube d'échantillon et anticoagulant appropriés suivant le tableau ci-dessous. Les échantillons prélevés des patients qui reçoivent de l'eptifibatide (Integrilin) doivent être prélevés seulement dans des tubes contenant de l'héparine de lithium.

Greiner 454322 (tube de citrate de 2 ml)	Greiner 454323 (tube de citrate de 2 ml pour altitudes élevées)	Greiner 454244 (tube d'héparine de lithium de 3 ml)

Tableau 1 : Tubes de prélèvement sanguin

Instructions pour les prélèvements effectués au moyen d'un cathéter veineux à demeure :

Remarque : ne pas utiliser de cathéter intraveineux.

1. Un prélèvement (environ 5 ml) sur tube sec doit être fait afin de purger la tubulure avant de prélever les échantillons de sang total au moyen d'un cathéter à demeure. Vérifier qu'il n'y aucun caillot dans le cathéter à demeure. **Après le prélèvement, transférer immédiatement le sang dans le tube de prélèvement approprié.**

Remarque : utiliser au besoin une aiguille de calibre 21 G ou supérieure (p. ex. de calibre 18 à 20 G).

2. Retourner délicatement le tube d'échantillon **5 fois** afin d'assurer le mélange complet de son contenu.
3. Réaliser le test de l'échantillon dans les 15 minutes suivant son prélèvement comme indiqué dans le déroulement du test.
4. Ne pas utiliser le sang prélevé pendant l'introduction d'un cathéter intraveineux.

Instructions pour le prélèvement d'échantillons périphériques :

1. Le sang total peut être prélevé à partir de sites veineux à l'aide d'une aiguille de calibre 21 G ou supérieure (p. ex. de calibre 18 à 20 G) dans un tube de prélèvement approprié. Les échantillons doivent être obtenus à partir d'une extrémité dépourvue de perfusion veineuse périphérique.
2. Prélever d'abord un tube à jeter (environ 2 ml). Le tube à jeter ne doit pas contenir d'EDTA.
3. Retourner délicatement le tube d'échantillon au moins 5 fois afin d'assurer le mélange complet de son contenu.
4. Réaliser le test de l'échantillon dans les 15 minutes suivant son prélèvement comme indiqué dans le déroulement du test.
5. Ne pas utiliser le sang prélevé pendant l'introduction d'un cathéter intraveineux.

MISES EN GARDE CONCERNANT LE PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

- Une technique de prélèvement de sang incorrecte risque de déclencher un message d'alerte. Consulter le manuel d'utilisation du système VerifyNow pour de plus amples détails sur ce message.
- Utiliser uniquement des aiguilles de calibre 21 G ou plus pour le prélèvement ou le transfert sanguin.
- Les échantillons doivent être conservés en position verticale avant le test ; éviter tout contact prolongé avec le bouchon en caoutchouc du tube de prélèvement de sang.
- Éviter d'utiliser un agitateur ou un système de tubes pneumatiques de transport.
- Le prélèvement de l'échantillon de sang doit être réalisé avec soin afin d'éviter l'hémolyse ou la contamination par des facteurs tissulaires. Ne pas utiliser les échantillons présentant une coagulation.
- Le premier tube de prélèvement doit être mis au rebut (environ 2 ml).
- Si, lors du prélèvement d'un échantillon pour le test VerifyNow IIb/IIIa, du sang est aussi prélevé pour un hémogramme, remplir le tube pour l'échantillon VerifyNow en premier. Remplir le tube pour l'hémogramme après celui pour l'échantillon VerifyNow.
- Les échantillons de sang total frais doivent être utilisés dans les 15 minutes suivant leur prélèvement.
- Toujours s'assurer que les tubes de prélèvement sont remplis jusqu'aux graduations indiquées. À des altitudes supérieures à 750 m au-dessus du niveau de la mer, les tubes de prélèvement sanguin risquent de ne pas se remplir jusqu'à la graduation spécifiée, ce qui entraîne un rapport incorrect du sang par rapport à l'anticoagulant. Les utilisateurs travaillant à ces altitudes doivent consulter les protocoles de prélèvement sanguin de leur établissement ou les recommandations du fabricant de tubes de prélèvement de sang pour savoir comment remplir les tubes correctement.
- Ne pas congeler ou réfrigérer les échantillons sanguins.
- Tous les échantillons des patients doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des maladies.
- Suivre les précautions universelles.

DÉROULEMENT DU TEST

1. Sélectionner le type d'échantillon à tester : WQC VerifyNow ou un échantillon de sang du patient.
2. Ouvrir le sachet en aluminium et retirer la cartouche. Ne manipuler les cartouches que par leur poignée (**Voir la figure 1**).

3. Retirer la gaine protectrice de l'aiguille en tirant directement dessus. Ne pas tordre la gaine pour éviter de détacher l'aiguille.
4. À l'invite de l'instrument, insérer la cartouche dans l'instrument.
5. À l'invite de l'instrument, retourner le tube à échantillon au moins 5 fois, puis l'enfiler sur l'aiguille de la cartouche. Refermer le couvercle du puits d'analyse.
6. L'instrument effectue le test et affiche le résultat.

MISE EN GARDE	**L'échantillon est sous pression. Ne pas retirer le tube d'échantillon de la cartouche.**

7. Retirer la cartouche en la saisissant par sa poignée et en tirant tout droit. Ne pas retirer le tube de la cartouche. Jeter l'ensemble cartouche-tube d'échantillon dans un récipient approprié pour les déchets contaminés.

Consulter le guide de l'utilisateur du système VerifyNow pour obtenir les instructions complètes sur son fonctionnement.

MATÉRIEL FOURNI

10 cartouches VerifyNow IIb/IIIa (numéro de catalogue 85310) conditionnées individuellement dans des sachets en aluminium scellés. Chaque cartouche contient des billes revêtues de fibrinogène lyophilisé, de l'iso-TRAP, de l'albumine sérique bovine et un tampon.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Système VerifyNow (numéro de catalogue 86000)
- Kit WQC du test VerifyNow (numéro de catalogue 85047)
- Tubes de prélèvement sanguin figurant au **tableau 1**

Remarque : le citrate de sodium ne doit pas être utilisé comme un anticoagulant lors de la mesure de prélèvements de patients traités par l'eptifibatide.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Contrôles électroniques de l'instrument

- Pour assurer le fonctionnement de l'instrument, le fabricant recommande d'effectuer un contrôle de la qualité électronique (EQC) une fois par jour. Ce dispositif réutilisable vérifie les éléments optiques et pneumatiques de l'instrument ainsi que le mélange des réactifs. Consulter la section Contrôle de qualité du manuel d'utilisation du système VerifyNow pour des instructions sur l'exécution du contrôle EQC.
- L'instrument vérifie automatiquement le remplissage des échantillons, le transfert correct des liquides et le mélange. Il contrôle également les composants électroniques et mécaniques.

Contrôles de la cartouche

Le test VerifyNow IIb/IIIa contient le contrôle interne suivant :

- **Contrôle négatif :** chaque cartouche contient des contrôles internes qui déterminent si le résultat du test VerifyNow IIb/IIIa est valide ; un message s'affiche en cas d'erreur. Le contrôle interne négatif est effectué au cours des cinq premières secondes de l'essai, avant l'activation plaquettaire et la liaison aux billes recouvertes de fibrinogène.

Contrôle de la qualité liquide

Les contrôles de la qualité liquide VerifyNow niveaux 1 et 2 sont formulés à des niveaux cliniquement pertinents et peuvent être utilisés dans le cadre du programme de contrôle de la qualité du laboratoire. Les plages acceptables de ces niveaux 1 et 2 sont imprimées sur le sachet de la cartouche.

Le fabricant recommande d'exécuter un WQC de niveau 2 chaque fois qu'un nouveau lot ou un nouvel arrivage de kits de test VerifyNow IIb/IIIa est reçu. Le contrôle WQC VerifyNow (numéro de catalogue 85047) est disponible auprès du fabricant. Pour de plus amples informations, consulter la notice du contrôle WQC.

Pour toute question concernant le matériel de contrôle WQC, appeler le service technique d'Accumetrics.

DÉPANNAGE

Dans certaines conditions, l'instrument affiche un message d'erreur (Error) ou d'alarme (Alarm). Consulter le manuel d'utilisation du système VerifyNow pour de plus amples détails sur ces messages. Pour une aide supplémentaire concernant le dépannage, appeler le service technique d'Accumetrics au +1 (858) 643-1600 ou envoyer un courriel à support@accumetrics.com.

ÉTALONNAGE

Les cartouches test VerifyNow IIb/IIIa sont étalonnées en usine. Les informations concernant l'étalonnage sont comprises dans le code à barres de chaque cartouche et sont automatiquement lues par l'instrument.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Le test VerifyNow IIb/IIIa exprime les résultats des patients en unités d'agrégation plaquettaire (Platelet Aggregation Units, ou PAU), qui sont calculées en fonction de la vitesse et de l'étendue de l'agrégation. L'instrument VerifyNow permet aussi à l'utilisateur de calculer le pourcentage d'inhibition pour un patient donné à condition qu'une valeur PAU de référence ait été obtenue avant l'administration du médicament. L'utilisation des inhibiteurs de la GP IIb/IIIa, tels que l'abciximab et l'eptifibatide, s'est avérée une stratégie antithrombotique utile[1]. Chez les patients recevant de l'abciximab ou de l'eptifibatide et chez les modèles animaux de thrombose coronaire avec l'abciximab, la réponse à l'agrégation plaquettaire ex vivo a été pratiquement abolie lorsque le blocage de la GPIIb/IIIa était maintenu stationnaire > 80 %[2,3]. Une autre étude a montré qu'avec tous les inhibiteurs de la GPIIb/IIIa, y compris l'abciximab et l'eptifibatide, une inhibition de la fonction plaquettaire > 95 % 10 minutes après le début du traitement était associée à une diminution importante de l'incidence d'un trouble cardiaque majeur[4].

Plages de référence

Le test VerifyNow IIb/IIIa a été utilisé au cours d'études cliniques menées dans 9 centres et portant sur des sujets subissant une intervention coronarienne percutanée. Le test a été réalisé sur des échantillons provenant de 173 patients devant être traités par l'abciximab (173 en référence et 173 après l'abciximab) et également sur des échantillons provenant de 114 patients devant être traités par l'eptifibatide (114 en référence et 97 après l'eptifibatide). Le **tableau 2** présente les valeurs PAU moyennes de référence (avant l'administration de l'abciximab ou de l'eptifibatide), inhibition > 80 % et > 95 %.

	Abciximab			Eptifibatide		
PAU	**Référence**	**≥ 80 %**	**≥ 95 %**	**Référence**	**≥ 80 %**	**≥ 95 %**
n	173	173	130	114	97	50
Moyenne	224	9	2	199	11	3
ÉT	54	20	4	40,6	9,4	3
Plage de référence	125-330	0-44	0-13	136-288	0-31	0-10

Tableau 2 : Plages de référence

LIMITES DU TEST

Des retards au niveau du test ou un prélèvement difficile des échantillons peuvent donner des résultats erronés.

Le réactif lyophilisé est hygroscopique et peut se dégrader après une exposition prolongée à l'air ambiant. C'est pourquoi la cartouche doit être utilisée très rapidement après son retrait du sachet.

Lorsque les résultats ne sont pas compris dans les limites attendues, explorer la possibilité d'un prélèvement ou d'une manipulation incorrects de l'échantillon. Répéter le test en utilisant une nouvelle cartouche et un nouvel échantillon. Aucune étude n'a été réalisée quant à l'utilisation du test VerifyNow IIb/IIIa pour les patients porteurs de troubles héréditaires tels que la maladie de von Willebrand, la thrombasthénie de Glanzmann et le syndrome de Bernard-Soulier. Le test VerifyNow IIb/IIIa n'est pas destiné à être utilisé si ces types de troubles plaquettaires sont présents. Aucune étude n'a été menée sur les patients ayant des antécédents connus de numération plaquettaire < 100 x 109/l. Le test VerifyNow IIb/IIIa n'a pas été comparé à l'agrégométrie plaquettaire chez les patients qui présentent une diminution de 30 % de la numération plaquettaire PRP. Les résultats du test VerifyNow IIb/IIIa doivent être interprétés en conjonction avec les autres données cliniques et de laboratoire dont dispose le clinicien.

Les plages de référence ont été calculées conformément aux directives du CLSI. Les caractéristiques démographiques suivantes ont été prises en compte : sexe, ethnicité, tabagisme actif et utilisation antérieure de l'abciximab. La valeur PAU moyenne de référence était cohérente sur l'ensemble des groupes, et aucun biais statistiquement significatif n'a été démontré dans aucune des variables démographiques testées. Une analyse des données cliniques et des informations démographiques associées a indiqué qu'il n'était pas nécessaire de créer des plages de référence distinctes basées sur les variables démographiques. Comme démontré, il n'y a aucun chevauchement entre les plages de référence basale et d'inhibition, ce qui élimine toute ambiguïté d'interprétation pour le clinicien.

CARACTÉRISTIQUES DE FONCTIONNEMENT

Des études évaluant le test VerifyNow IIb/IIIa chez des patients traités par l'abciximab ont comparé le test VerifyNow IIb/IIIa à un essai de blocage des récepteurs par l'abciximab-125 I (Receptor Blockade Assay ou RBA), qui quantifie les molécules liées par plaquette et l'agrégométrie plaquettaire à l'aide d'un agrégomètre optique CHRONO-LOG, et 20 µM d'ADP comme agoniste, afin de détecter la pente maximale sur une période de cinq minutes. L'unité de mesure du test VerifyNow IIb/IIIa est la PAU, basée sur la vitesse ainsi que sur l'étendue de la liaison des plaquettes aux billes recouvertes de fibrinogène sur une période déterminée.

Des études évaluant le test VerifyNow IIb/IIIa chez des patients traités par l'eptifibatide ont comparé le test VerifyNow IIb/IIIa au même test d'agrégométrie plaquettaire décrit ci-dessus et à un test de cytométrie en flux des plaquettes mesuré en unités de fluorescence moyennes.

Les essais cliniques étaient conçus pour obtenir des échantillons à trois moments spécifiques : 1) à la référence, avant l'administration de l'abciximab ou de l'eptifibatide ; 2) pendant la perfusion, dans l'heure suivant l'administration du bolus et 3) après la perfusion, 24 heures après le bolus ou au moment de la sortie d'hôpital du patient, selon la date d'antériorité, afin d'évaluer le temps nécessaire au rétablissement de la fonction plaquettaire. Pour chaque patient, un échantillon basal, un échantillon pendant la perfusion et un échantillon après la perfusion (24 heures) ont été mesurés à l'aide de chacune des méthodes de test et les résultats ont été enregistrés.

Les **figures 2** et **3** indiquent l'évolution temporelle de l'inhibition plaquettaire pour les trois méthodes, sous forme de points individuels et d'écart type +/- moyen, respectivement, et illustrent la concordance des trois méthodes. (Voir les **figures 2** et **3**)

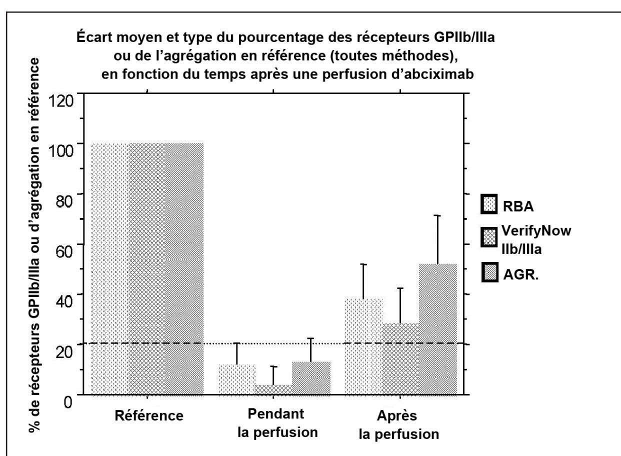


Figure 2 : Moyenne et écart-type du pourcentage des récepteurs GPIIb/IIIa ou de l'agrégation en référence (toutes méthodes), en fonction du temps après une perfusion d'abciximab

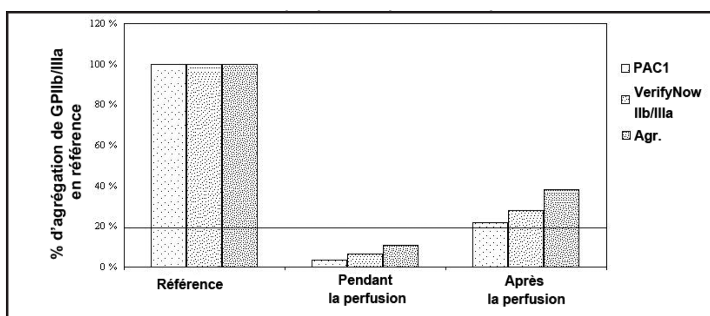


Figure 3 : Pourcentage moyen d'agrégation de GPIIb/IIIa en référence (toutes méthodes) en fonction du temps après une perfusion d'eptifibatide

Corrélation entre les méthodes

La corrélation entre les méthodes a été évaluée par une analyse de régression basée sur les données des patients traités par l'abciximab et l'eptifibatide. Les données ont été analysées pour déterminer la corrélation entre le test VerifyNow IIb/IIIa, l'essai RBA et l'agrégométrie plaquettaire chez les patients traités par l'abciximab, et avec la cytométrie en flux PAC1 et l'agrégométrie plaquettaire chez les patients traités par l'eptifibatide. Les points de données pour l'analyse clinique ont été exprimés en unités brutes pour chaque test : PAU pour le test VerifyNow IIb/IIIa ; pente pour l'agrégométrie ; molécules par plaquette liée pour l'essai RBA ; et fluorescence moyenne pour la cytométrie en flux PAC1. (Voir les **figures 4, 5, 6 et 7**)

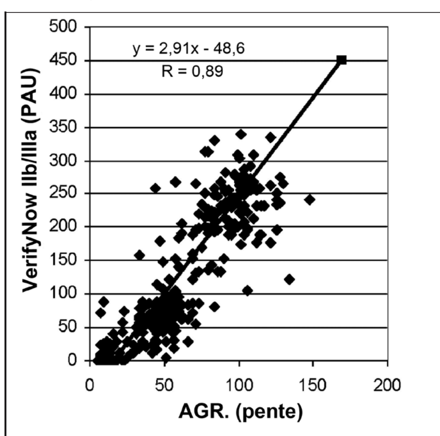


Figure 4 : Régression de Deming, test VerifyNow IIb/IIIa par rapport à l'agrégométrie

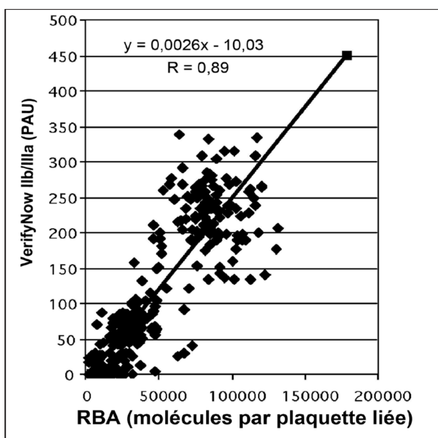


Figure 5 : Régression de Deming, test VerifyNow IIb/IIIa par rapport au blocage des récepteurs

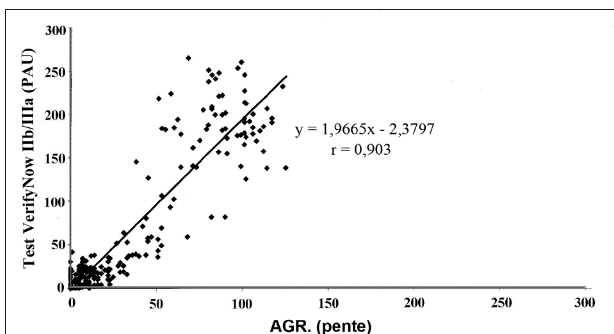


Figure 6 : Test VerifyNow IIb/IIIa par rapport à l'agrégométrie eptifibatide

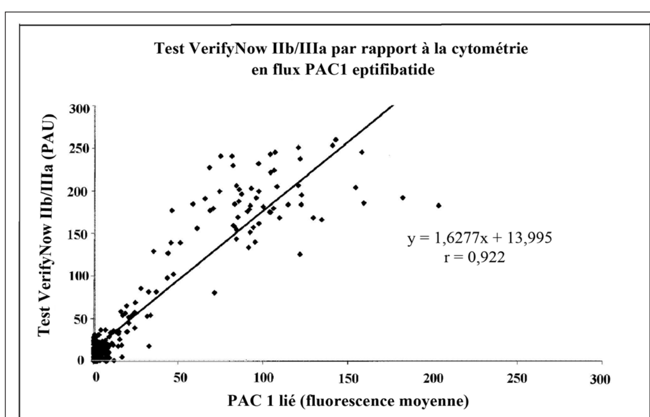


Figure 7 : Test VerifyNow IIb/IIIa par rapport à la cytométrie en flux PAC1 eptifibatide

Sensibilité analytique

Le test VerifyNow IIb/IIIa a été utilisé (n = 6 par patient) sur seize patients traités par l'abciximab et mesuré à 10 minutes d'intervalle après l'administration du bolus. La sensibilité analytique du test était de 8 PAU (2 X ÉT).

Linéarité

La **figure 8** indique la linéarité du système VerifyNow. Le test comprenait plusieurs donneurs traités ex-vivo par neuf concentrations d'eptifibatide sur plusieurs jours, évalués à plusieurs reprises. Les données de linéarité indiquent que la relation entre la concentration d'eptifibatide et le pourcentage d'inhibition n'est pas linéaire.

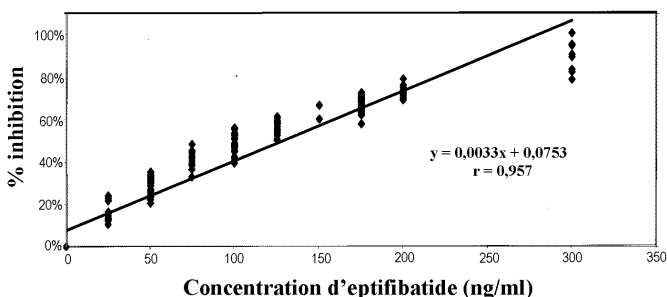


Figure 8 : Linéarité du système VerifyNow, n = 29, dosage ex-vivo, plusieurs jours

Précision

La précision simple et complexe de l'abciximab et de l'eptifibatide a été calculée selon les directives de précision du CLSI à l'aide de trois lots de cartouches VerifyNow IIb/IIIa et de deux instruments pour l'abciximab, et de deux lots de cartouches et de trois instruments pour l'eptifibatide. Du sang total a été prélevé chez des donneurs bénévoles sur une période de 20 jours. Le CV intra-série présenté dans les **tableaux 2 et 3** est défini par le CLSI comme la valeur de précision intra-série. (Voir les **tableaux 3 et 4**)

Précision complexe sang total				Intra-série (simple)		Total	
Description	**n (jours)**	**n (résultats)**	**Moyenne**	**ÉT**	**% CV**	**ÉT**	**% CV**
Homme, 32 ans	20	78	147,8	9,2	6,2	13,9	9,4
Homme, 28 ans	20	77	185,3	12,2	6,6	16,0	8,6

Tableau 3 : Statistiques de la précision complexe (eptifibatide) définies par le CLSI

Précision complexe sang total				Intra-série (simple)		Total	
Description	**n (jours)**	**n (résultats)**	**Moyenne**	**ÉT**	**% CV**	**ÉT**	**% CV**
Femme, 26 ans	20	80	186,3	9,8	5,2	18,7	9,9
Femme, 41 ans	20	80	187,0	9,1	4,9	26,1	13,9
Homme, 29 ans	20	80	244,8	11,1	4,9	25,9	11,5

Tableau 4 : Statistiques de la précision complexe (abciximab) définies par le CLSI

La précision simple a été déterminée à l'aide du contrôle de la qualité liquide de niveau 2 du test VerifyNow IIb/IIIa. Trois lots de cartouches ont été testés chacun 20 fois à l'aide d'un lot de contrôle unique. Cette étude a été répétée ultérieurement avec un nouveau lot de contrôle. Les résultats sont indiqués au **tableau 4**. (Voir le **tableau 5**)

Variation d'un lot de cartouches à un autre				
Lot de la cartouche	**n**	**Moyenne PAU**	**ÉT**	**CV***
1	20	202	12	6,0
2	20	180	15	8,3
3	20	176	17	9,9

Tableau 5 : Précision simple

*Le coefficient de variation du fabricant est < 10 %.

Substances interférentes

Les données de l'étude clinique ont été évaluées pour déterminer l'effet des médicaments potentiellement interférents sur les valeurs PAU. Les valeurs PAU de référence ont été comparées pour les patients traités ou non avec les médicaments suivants, et aucune différence n'a été observée : aspirine, ticlopidine, clopidogrel, héparine, warfarine, acétaminophène, AINS, béta-bloquants, inhibiteurs calciques, statines et nitrates.

L'aspirine et l'héparine ont été étudiées de manière plus approfondie dans la mesure où ces substances sont souvent co-administrées avec la thérapie GP IIb/IIIa. Des concentrations variables des deux médicaments ont été évaluées dans des études in-vitro, et aucun effet notable sur les valeurs PAU n'a été observé. Ces données correspondent aux données rapportées par Coller qui a utilisé une version prototype antérieure du test VerifyNow IIb/IIIa[5].

L'effet des numérations plaquettaires, des hématocrites et de la concentration de fibrinogène a été étudié dans deux essais cliniques. La performance du test n'a pas été influencée par les numérations plaquettaires comprises entre 98 000 et 376 000 plaquettes par microlitre, ou les hématocrites compris entre 23 et 45 %. Aucune interférence avec la performance du test VerifyNow IIb/IIIa n'a été observée lors de l'analyse d'échantillons contenant des concentrations de fibrinogène comprises entre 104 et 617 mg/dl. On a constaté qu'une lipémie modérée induisait une augmentation des valeurs PAU de 16 %.

Un autre inhibiteur intraveineux de la GP IIb/IIIa, le tirofiban (Aggrastat®), est approuvé pour le traitement des patients souffrant d'angor instable. Les patients qui ont été traités par le tirofiban peuvent être envoyés en salle de cathétérisme cardiaque pour une intervention coronarienne percutanée. Le test VerifyNow IIb/IIIa peut détecter l'inhibition plaquettaire par ce médicament ; les résultats de ce test pour ces patients doivent donc être interprétés avec prudence. Un échantillon prélevé avant l'administration de l'abciximab (ReoPro®) ou de l'eptifibatide (Integrilin®) ne peut pas être utilisé pour établir un résultat de référence ou non inhibé si un inhibiteur de la GP IIb/IIIa a été administré dans les 10 jours précédents.

VerifyNow® IIb/IIIa
ANALISI DI REATTIVITÀ PIASTRINICA

Accu:metrics®

ISTRUZIONI PER L'USO

Assistenza tecnica
(USA) +1 858 643 1600
support@accumetrics.com

USO PREVISTO

L'analisi VerifyNow IIb/IIIa è un'analisi semi-quantitativa di misurazione della funzione piastrinica su sangue intero, usata per misurare il blocco del recettore della glicoproteina (GP) IIb/IIIa in pazienti trattati con abciximab o eptifibatide. I risultati dell'analisi VerifyNow IIb/IIIa devono essere interpretati nel quadro degli altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del medico.

Per uso diagnostico in vitro.

SINTESI E SPIEGAZIONE

Il sistema VerifyNow è un sistema di rilevazione ottica a base turbidimetrica, che misura l'aggregazione piastrinica indotta. Il sistema consiste in uno strumento, un dispositivo monouso di analisi e dispositivi di controllo qualità. Vedere la **Figura 1** per una rappresentazione del dispositivo di analisi. Le misure di controllo qualità comprendono un controllo elettronico di qualità (EQC o electronic quality control) incorporato nello strumento, due livelli di controllo qualità dei reagenti (WQC o wet quality control), controlli interni di qualità e controlli di spedizione. Lo strumento controlla tutta la sequenza dell'analisi, la temperatura e la miscelazione reagente-campione ed esegue l'autodiagnosi. Viene determinato il funzionamento delle piastrine e quindi visualizzato il risultato.

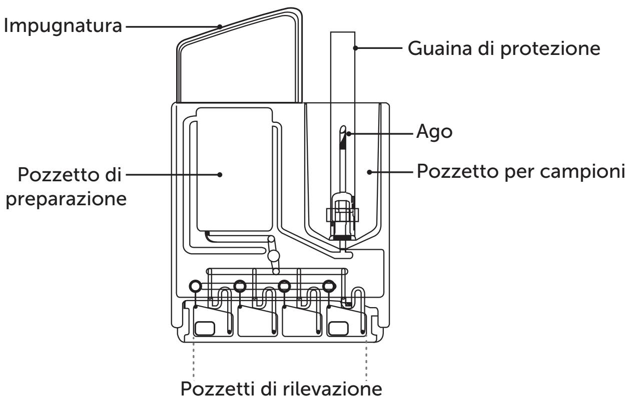


Figura 1: Dispositivo di analisi

Ciascun dispositivo di analisi monouso contiene un preparato liofilizzato di sferule rivestite di fibrinogeno umano, peptide attivatore del recettore della trombina (iso TRAP) e soluzione tampone. Lo strumento estrae automaticamente dalla provetta di prelievo il campione di sangue intero anticoagulato del paziente e lo dosa nel dispositivo di analisi, evitando quindi contatto diretto del sangue da parte dell'operatore.

PRINCIPIO DELL'ANALISI

VerifyNow IIb/IIIa è stato studiato per valutare la funzione piastrinica in base alla capacità delle piastrine attivate di legare il fibrinogeno. Le piastrine si aggregano sulle micro particelle (sferule) rivestite di fibrinogeno in proporzione al numero di recettori piastrinici GP IIb/IIIa attivati. La frequenza di aggregazione delle microsferule è più rapida e riproducibile se le piastrine sono attivate. Tale attivazione viene ottenuta inglobando il reagente iso-TRAP nel canale di analisi senza formazione di fibrina. La trasmittanza luminosa aumenta man mano che le piastrine attivate si legano e aggregano alle sferule rivestite di fibrinogeno. Lo strumento misura la variazione del segnale ottico ed esprime i risultati in unità di aggregazione piastrinica (PAU).

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico in vitro.

Lo strumento VerifyNow e i relativi componenti devono essere usati solamente nel modo indicato nel manuale operativo.

Non usare i dispositivi di analisi VerifyNow IIb/IIIa o i materiali WQC oltre la data di scadenza.

Tutti i campioni dei pazienti vanno trattati come se fossero potenzialmente infetti.

I reagenti sono prodotti con materiali purificati ricavati da plasma umano risultato negativo a tutte le malattie trasmissibili testate, comprese le analisi HIV-1, HIV-2, antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) e HCV. Trattare i dispositivi di analisi come materiali potenzialmente a rischio biologico e smaltirli in conformità alle normative vigenti.

Non tentare di estrarre la provetta di prelievo del sangue (o WQC) dal dispositivo di analisi dopo che è stata inserita sull'ago del dispositivo stesso.

CONSERVAZIONE E MANIPOLAZIONE DEI REAGENTI

Indicatore del kit analisi: ogni kit di analisi VerifyNow è munito di un indicatore di temperatura all'esterno della confezione. L'utente è tenuto a controllare l'indicatore all'atto della ricezione del kit. Un viraggio di colore dell'indicatore indica l'esposizione del kit a una temperatura elevata. In quel caso, occorre effettuare un controllo qualità dei reagenti WQC di livello 2 per accertarne la buona prestazione. L'indicatore di temperatura rileva errori dovuti a condizioni ambientali avverse.

Per conservazioni prolungate, mantenere i dispositivi di analisi a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. In alternativa, questi dispositivi di analisi possono essere conservati fino a 8 settimane a temperatura ambiente (tra 18 ° e 25 °C), ma non oltre la data di scadenza riportata sulla busta. Quando vengono tolti dalla refrigerazione, scrivere la data di scadenza sulla busta e/o sulla scatola del kit.

Prima dell'uso far raggiungere ai dispositivi di analisi la temperatura ambiente.

I dispositivi di analisi vanno estratti dalle buste laminate immediatamente prima dell'uso per impedire danni da umidità.

I dispositivi di analisi sono stabili fino alla data di scadenza riportata sulla confezione esterna.

PROCEDURA DI RACCOLTA DEL CAMPIONE

Istruzioni per la scelta della provetta di raccolta per tutti i campioni di sangue

I campioni devono essere raccolti con la provetta e l'anticoagulante idonei secondo la tabella seguente. I campioni prelevati da pazienti in terapia con eptifibatide (Integrilin) devono essere raccolti esclusivamente in provette contenenti eparina di litio.

Greiner 454322 (provetta con citrato da 2 ml)	Greiner 454323 (provetta con citrato da 2 ml per altitudine elevata)	Greiner 454244 (provetta con eparina di litio da 3 ml)

Tabella 1: Provette di prelievo del sangue

Istruzioni per il prelievo di campioni da cateteri venosi a permanenza

Nota: non utilizzare un catetere intravenoso

1. Il prelievo di campioni di sangue intero da un catetere a permanenza richiede il previo scarto di un volume sufficiente di sangue (circa 5 ml), per garantire la pulizia della linea. Verificare che il catetere a permanenza non presenti coaguli. **Trasferire il sangue nella provetta immediatamente dopo il prelievo.**

Nota: se si utilizza un ago per trasferire il sangue prelevato, tale ago deve essere di calibro 21 o superiore (ad es. calibro 18-20).

2. Capovolgere delicatamente la provetta di prelievo **5 volte**, in modo da assicurare la completa miscelazione del contenuto.
3. Sottoporre il campione ad analisi entro 15 minuti dal prelievo, come indicato nella sezione Procedura di analisi.
4. Non utilizzare il sangue prelevato durante l'inserimento di un catetere intravenoso.

Istruzioni per il prelievo di campioni periferici

1. Prelevare sangue intero tramite venipuntura con un ago di calibro pari o superiore a 21 (ad es., calibro 18-20), riempiendo una appropriata provetta di prelievo. I campioni ematici vanno prelevati da un arto non interessato da infusioni venose periferiche.
2. Prelevare per primo un campione di scarto (circa 2 ml). La provetta contenente lo scarto deve essere priva di EDTA.
3. Capovolgere delicatamente la provetta di prelievo almeno 5 volte, in modo da assicurare la completa miscelazione del contenuto.
4. Sottoporre il campione ad analisi entro 15 minuti dal prelievo, come indicato nella sezione Procedura di analisi.
5. Non utilizzare il sangue prelevato durante l'inserimento di un catetere intravenoso.

PRECAUZIONI IN MERITO AL PRELIEVO DEI CAMPIONI

- L'impiego di tecniche di prelievo errate può far attivare un messaggio di allerta. Per una descrizione particolareggiata di tale messaggio, si rimanda al manuale dell'utente del sistema VerifyNow.
- Utilizzare solo aghi calibro 21 o superiore per il prelievo o il trasferimento di sangue.
- I campioni di sangue devono essere tenuti in posizione verticale prima dell'analisi; evitare il contatto prolungato con il tappo di gomma sulla provetta di raccolta.
- Evitare l'uso di sistemi di trasporto oscillanti o con tubi pneumatici.
- Il prelievo del campione ematico va eseguito con cautela per evitare l'emolisi o la contaminazione da fattori tessutali. Non usare campioni che presentino coaguli.
- Gettare via la provetta del primo prelievo (circa 2 ml).
- Se si preleva sangue per eseguire un esame emocromocitometrico completo nello stesso momento in cui si effettua il prelievo per l'analisi VerifyNow IIb/IIIa, prelevare per primo il campione per VerifyNow. Riempire la provetta per l'esame emocromocitometrico completo dopo la provetta del campione per VerifyNow.
- Utilizzare i campioni di sangue intero entro 15 minuti dal prelievo.
- Accertarsi sempre che le provette di prelievo ematico siano riempite fino al livello indicato. Ad altitudini superiori a 750 metri s.l.m., le provette di prelievo possono non riempirsi con il volume specificato, producendo un rapporto errato sangue/anticoagulante. Per riempire opportunamente le provette di prelievo, gli utenti che operano a tali altitudini devono fare riferimento ai protocolli di prelievo del sangue del proprio centro o seguire i consigli del fabbricante delle provette stesse.
- Non refrigerare né congelare i campioni di sangue.
- Tutti i campioni dei pazienti vanno trattati come se fossero potenzialmente infetti.
- Adottare corrette precauzioni.

PROCEDURA DI ANALISI

1. Selezionare il tipo di campione da sottoporre ad analisi: VerifyNow WQC o campione di sangue del paziente.
2. Aprire la busta laminata ed estrarre il dispositivo di analisi. I dispositivi di analisi devono essere maneggiati afferrandoli solamente per l'impugnatura (**vedere la figura 1**).
3. Rimuovere la guaina protettiva dell'ago tirando direttamente la guaina. Non ruotare la guaina in quanto l'ago potrebbe staccarsi.
4. Al segnale emesso dallo strumento, inserire il dispositivo di analisi nello strumento.
5. Al segnale emesso dallo strumento, capovolgere delicatamente la provetta di prelievo 5 volte e inserire la provetta sull'ago del dispositivo di analisi. Chiudere il coperchio di ingresso.
6. Lo strumento esegue l'analisi e ne visualizza il risultato.

 ATTENZIONE	**Il campione è sotto pressione. Non rimuovere la provetta dal dispositivo di analisi.**

7. Estrarre il dispositivo di analisi afferrandolo per l'impugnatura e tirandolo verso l'alto senza inclinarlo. Non rimuovere la provetta dal dispositivo di analisi. Smaltire l'intero gruppo dispositivo/provetta in un appropriato contenitore per rifiuti pericolosi per rischio biologico.

Per istruzioni operative complete, fare riferimento al manuale operativo del sistema VerifyNow.

MATERIALI FORNITI

10 dispositivi di analisi VerifyNow IIb/IIIa (numero di catalogo 85310) confezionati singolarmente in buste laminate. Ciascun dispositivo di analisi contiene un preparato liofilizzato di sferule rivestite di fibrinogeno, iso-TRAP, sieroalbumina bovina e soluzione tampone.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Sistema VerifyNow (numero di catalogo 86000)
- Kit di WQC VerifyNow (numero di catalogo 85047)
- Provette di prelievo del sangue elencate nella **Tabella 1**

Nota: Non usare citrato di sodio come anticoagulante quando si misurano campioni provenienti da pazienti trattati con eptifibatide.

CONTROLLO QUALITÀ

Controlli elettronici dello strumento

- Il produttore suggerisce di eseguire un controllo elettronico di qualità (EQC) una volta al giorno al fine di garantire le prestazioni dello strumento. L'apposito dispositivo multiuso verifica il funzionamento dei componenti ottici e pneumatici dello strumento e la miscelazione. Si rimanda alla sezione Controllo qualità del manuale dell'utente del sistema VerifyNow per le istruzioni sull'esecuzione dell'EQC.
- Lo strumento verifica automaticamente il riempimento della provetta con il campione, il trasferimento dei fluidi e la miscelazione, oltre a monitorare i componenti elettronici e meccanici.

Controlli del dispositivo di analisi

L'analisi VerifyNow IIb/IIIa comprende il seguente controllo interno:

- **Controllo negativo.** Ogni dispositivo di analisi include controlli interni che determinano la validità dei risultati del analisi VerifyNow IIb/IIIa e generano un messaggio di errore sullo strumento in caso di risultati non validi. L'analisi di controllo interno negativo viene eseguita durante i primi cinque secondi del dosaggio, prima che si verifichino l'attivazione piastrinica e il legame alle sferule rivestite di fibrinogeno.

Controllo qualità dei reagenti (WQC)

I livelli 1 e 2 dei controlli WQC VerifyNow sono formulati a livelli clinicamente significativi e possono essere usati nell'ambito di un programma di controllo qualità di laboratorio. Gli intervalli accettabili per i livelli 1 e 2 dei controlli WQC VerifyNow sono riportati sulla busta del dispositivo di analisi.

Il produttore consiglia di eseguire un controllo WQC di livello 2 ogni volta che si riceve una nuova spedizione o un nuovo lotto di kit di analisi VerifyNow IIb/IIIa. I controlli WQC di VerifyNow (numero di catalogo 85047) sono disponibili presso il produttore. Per maggiori informazioni si rimanda al foglietto illustrativo dei controlli WQC.

Contattare l'assistenza tecnica Accumetrics per chiarimenti sui materiali WQC.

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

In alcune situazioni, lo strumento può visualizzare un messaggio di errore o di allarme. Per una descrizione particolareggiata di questi messaggi, si rimanda al manuale dell'utente del sistema VerifyNow. Per ulteriori risoluzioni di problemi, contattare l'assistenza tecnica Accumetrics: (telefono) +1 (858) 643-1600; (e-mail) support@accumetrics.com.

CALIBRAZIONE

I dispositivi analisi VerifyNow IIb/IIIa sono calibrati in fabbrica. Le informazioni sulla calibrazione sono contenute nel codice a barre riportato su ciascun dispositivo di analisi e vengono lette automaticamente dallo strumento.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dell'analisi VerifyNow IIb/IIIa sono espressi in unità di aggregazione piastrinica (PAU), calcolate in funzione della velocità e della portata dell'aggregazione. Lo strumento VerifyNow consente anche di calcolare la percentuale di inibizione del paziente, purché si sia ottenuto un valore PAU al basale prima della somministrazione del farmaco. L'impiego di inibitori GPIIb/IIIa quali abciximab e eptifibatide si è dimostrato utile come strategia antitrombotica.[1] In pazienti che avevano ricevuto abciximab o eptifibatide e in modelli animali di trombosi coronarica con abciximab, la risposta di aggregazione piastrinica ex vivo è stata virtualmente abolita quando il blocco di GPIIb/IIIa è stato mantenuto allo steady state >80%[2,3]. Ulteriori studi hanno dimostrato che con tutti gli inibitori di GPIIb/IIIa, inclusi abciximab e eptifibatide, l'inibizione della funzione piastrinica >95% 10 minuti dopo l'inizio della terapia era associata a una significativa riduzione dell'incidenza di un evento cardiaco avverso grave.[4]

Gamma di riferimento

L'analisi VerifyNow IIb/IIIa è stata eseguita in studi clinici presso 9 centri su pazienti sottoposti a intervento coronarico percutaneo. Le analisi sono state condotte su campioni di 173 pazienti con trattamento pianificato con abciximab (173 al basale e 173 post abciximab) e 114 pazienti con trattamento pianificato con eptifibatide (114 al basale e 97 post eptifibatide). La **Tabella 2** presenta i valori PAU medi al basale (prima della somministrazione di abciximab o di eptifibatide), inibizione >80% e >95%.

Abciximab				Eptifibatide		
PAU	Basale	≥80%	≥95%	Basale	≥80%	≥95%
n	173	173	130	114	97	50
Media	224	9	2	199	11	3
DS	54	20	4	40,6	9,4	3
Intervallo di riferimento	125-330	0-44	0-13	136-288	0-31	0-10

Tabella 2: Gamma di riferimento

LIMITAZIONI

Ritardi nell'analisi o difficoltà di raccolta di campioni potrebbero causare valori spuri.

Il reagente liofilizzato è igroscopico e può degradarsi a seguito dell'esposizione prolungata all'aria. È importante usare il dispositivo di analisi entro breve tempo dalla sua estrazione dalla busta laminata.

Quando i risultati non rientrano nei limiti previsti, occorre verificare le procedure usate per il prelievo o il maneggio del campione. Ripetere l'analisi usando un nuovo dispositivo di analisi e un altro campione. L'analisi VerifyNow IIb/IIIa non è stata studiata su pazienti con disordini piastrinici ereditari quali la malattia di von Willebrand, la tromboastenia di Glanzmann e la sindrome di Bernard-Soulier e non ne è previsto l'uso con questi tipi di affezioni. Non sono stati studiati pazienti con precedenti di conteggi piastrinici <100 x109/l. L'analisi VerifyNow IIb/IIIa non è stata confrontata con l'aggregometria piastrinica in pazienti con una riduzione del 30% nella conta piastrinica PRP. I risultati dell'analisi VerifyNow IIb/IIIa devono essere interpretati nel quadro degli altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del medico.

La gamma di riferimento è stata calcolata utilizzando le linee guida CLSI. Sono state considerate le seguenti caratteristiche demografiche: sesso, etnia, abitudine al fumo e precedente uso di abciximab. Il PAU medio al basale era coerente in tutti i gruppi, e non è stato dimostrato alcun bias statisticamente significativo in nessuna delle variabili demografiche testate. Un'analisi dei dati clinici e delle informazioni demografiche associate ha dimostrato che non vi era necessità di creare una gamma di riferimento separata sulla base delle variabili demografiche. Come è stato dimostrato, non vi era alcuna sovrapposizione tra la gamma di riferimento al basale e quella dell'inibizione, il che fornisce al medico un'interpretazione non ambigua.

PERFORMANCE

Studi sulla valutazione dell'analisi VerifyNow IIb/IIIa in pazienti trattati con abciximab hanno confrontato l'analisi VerifyNow IIb/IIIa con un'analisi di blocco del recettore (RBA) 125 I-abciximab che quantificava le molecole legate per piastrina e l'aggregometria piastrinica usando un aggregometro ottico CHRONO-LOG con 20 µM ADP come agonista per rilevare la pendenza massima in un periodo di cinque minuti. L'unità di misura dell'analisi VerifyNow IIb/IIIa è la PAU, basata sul tasso e sulla portata del legame tra piastrine e sferule rivestite di fibrinogeno per un dato periodo.

Studi sulla valutazione dell'analisi VerifyNow IIb/IIIa in pazienti trattati con eptifibatide hanno confrontato l'analisi VerifyNow IIb/IIIa con la stessa analisi di aggregometria piastrinica descritta precedentemente e un'analisi citometrica di flusso piastrinico misurato come unità di fluorescenza media.

Le sperimentazioni cliniche sono state studiate per ottenere campioni in tre punti nel tempo: 1) al basale, prima della somministrazione di abciximab o di eptifibatide; 2) durante l'infusione, entro 1 ora dalla somministrazione del bolo e 3) dopo l'infusione, 24 ore dopo la somministrazione del bolo e all'atto delle dimissioni, a seconda di quale delle due eventualità si fosse verificata per prima, allo scopo di valutare il recupero della funzione piastrinica. I campioni di ciascun paziente, prelevati al basale, durante l'infusione e postinfusione (24 ore), sono stati misurati con entrambi i metodi di analisi, registrando i relativi risultati.

Le **Figura 2** e **3** mostrano il decorso temporale dell'inibizione piastrinica, rispettivamente per i tre metodi come punti singoli e la media +/- deviazione standard, e illustrano la corrispondenza dei tre metodi (vedere le **Figura 2** e **3**).

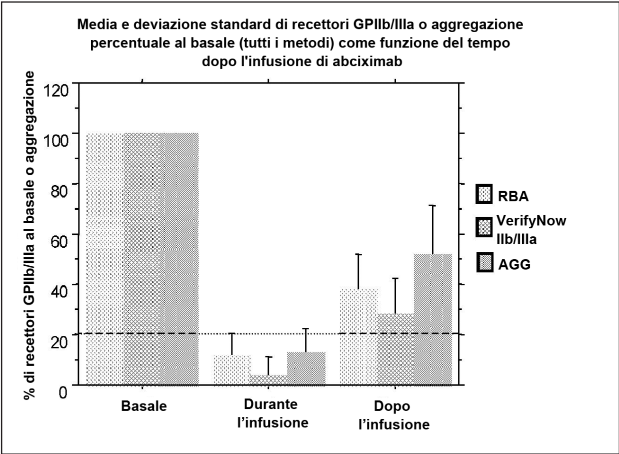


Figura 2: Media e deviazione standard di recettori GPIIb/IIIa o aggregazione percentuale al basale (tutti i metodi) come funzione del tempo dopo l'infusione di abciximab

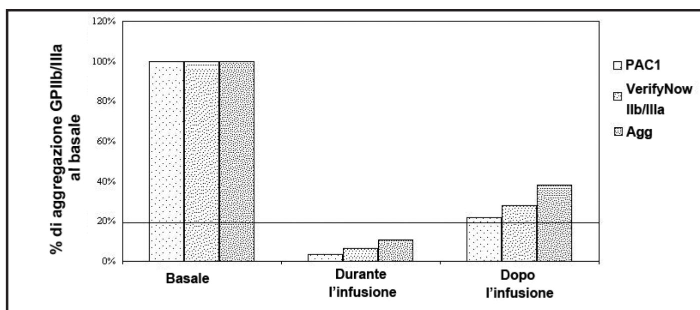


Figura 3: Aggregazione GPIIb/IIIa media percentuale al basale (tutti i metodi) come funzione del tempo dopo l'infusione di eptifibatide

Correlazione metodologica

La correlazione tra i metodi è stata valutata con analisi della regressione basata su dati di pazienti trattati con abciximab e eptifibatide. I dati sono stati analizzati per determinare la correlazione dell'analisi VerifyNow IIb/IIIa con RBA e aggregometria piastrinica in pazienti trattati con abciximab, e con citometria a flusso PAC1 e aggregometria piastrinica in pazienti trattati con eptifibatide. I punti di riferimento per l'analisi clinica sono stati riportati in unità grezze per ogni analisi: PAU per l'analisi VerifyNow IIb/IIIa; pendenza per aggregometria; molecole per legame piastrinico per RBA; e fluorescenza media per citometria a flusso PAC1 (vedere le **Figura 4, 5, 6** e **7**).

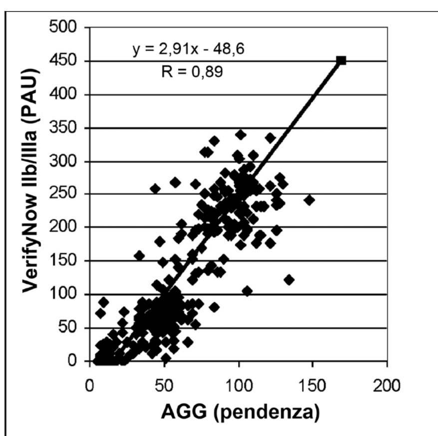


Figura 4: Regressione di Deming, analisi VerifyNow IIb/IIIa rispetto ad aggregometria

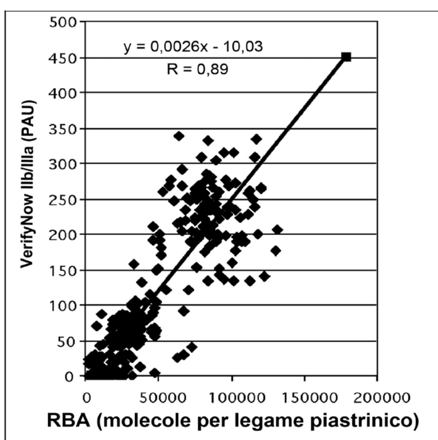


Figura 5: Regressione di Deming, analisi VerifyNow IIb/IIIa rispetto a blocco dei recettori

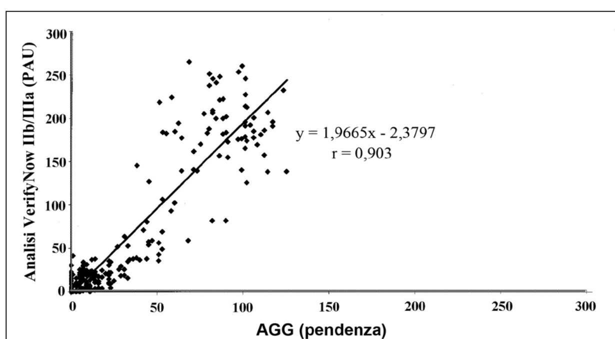


Figura 6: Analisi VerifyNow IIb/IIIa rispetto ad aggregometria - eptifibatide

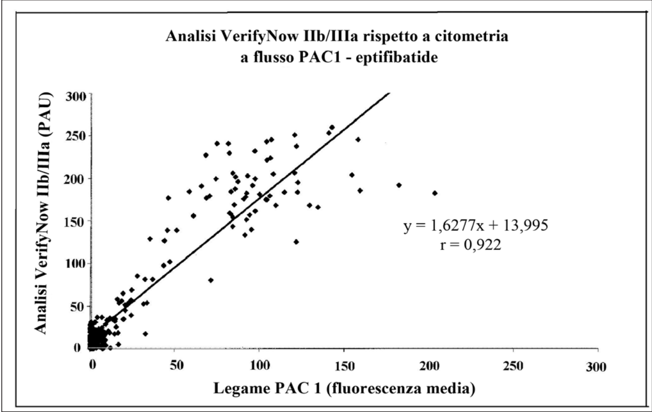


Figura 7: Analisi VerifyNow IIb/IIIa rispetto a citometria a flusso PAC1 - eptifibatide

Sensibilità analitica

L'analisi VerifyNow IIb/IIIa è stata condotta (n=6 per paziente) su sedici pazienti dosati con abciximab e misurati 10 minuti dopo il bolo. La sensibilità analitica dell'analisi è risultata pari a 8 PAU (2 X DS).

Linearità

La **Figura 8** mostra la linearità del sistema VerifyNow. L'analisi consisteva in donatori multipli ex-vivo dosati a nove concentrazioni di eptifibatide per diversi giorni con diversi replicati. I dati di linearità dimostrano che il rapporto tra concentrazione di eptifibatide e % di inibizione non è lineare.

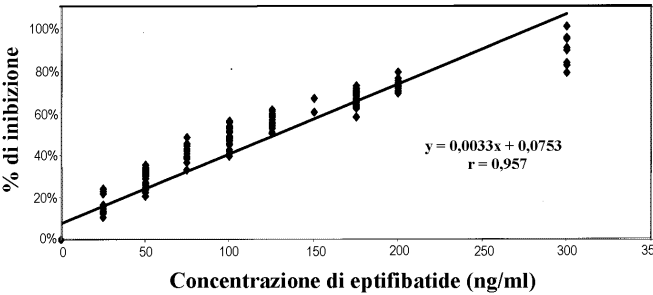


Figura 8: Linearità del sistema VerifyNow n=29, dosati ex-vivo, per più giorni

Precisione

La precisione semplice e la precisione complessa per abciximab e per eptifibatide sono state calcolate secondo le linee guida CLSI con tre lotti di analisi VerifyNow IIb/IIIa e due strumenti per abciximab, e con due lotti di analisi e tre strumenti per eptifibatide. Il sangue intero è stato prelevato da donatori volontari per 20 giorni. Il CV intraserie presentato nelle **Tabelle 2 e 3** è definito dal CLSI come valore della precisione all'interno dello stesso ciclo di analisi (intraserie) (vedere le **Tabelle 3 e 4**).

Precisione complessa, sangue intero				Intraserie (semplice)		Totale	
Descrizione	**n (giorni)**	**n (risultati)**	**Media**	**DS**	**CV %**	**DS**	**CV %**
Uomo età 32 anni	20	78	147,8	9,2	6,2	13,9	9,4
Uomo età 28 anni	20	77	185,3	12,2	6,6	16,0	8,6

Tabella 3: Statistiche di precisione complessa (Eptifibatide) secondo la definizione di CLSI

Precisione complessa, sangue intero				Intraserie (semplice)		Totale	
Descrizione	**n (giorni)**	**n (risultati)**	**Media**	**DS**	**CV %**	**DS**	**CV %**
Donna età 26 anni	20	80	186,3	9,8	5,2	18,7	9,9
Donna età 41 anni	20	80	187,0	9,1	4,9	26,1	13,9
Uomo età 29 anni	20	80	244,8	11,1	4,9	25,9	11,5

Tabella 4: Statistiche di precisione complessa (Abciximab) secondo la definizione di CLSI

La precisione semplice è stata determinata per il WQC dell'analisi VerifyNow IIb/IIIa di livello 2. Tre lotti di dispositivi di prova sono stati testati ciascuno 20 volte usando un solo lotto di controllo. Questo studio è stato ripetuto successivamente con un nuovo lotto di controllo. I risultati sono illustrati nella **Tabella 4** (vedere **Tabella 5**).

Variazione cartuccia da lotto a lotto				
Lotto dispositivo	**n**	**Media PAU**	**DS**	**CV***
1	20	202	12	6,0
2	20	180	15	8,3
3	20	176	17	9,9

Tabella 5: Precisione semplice

* La specifica del produttore relativa al coefficiente di variazione è <10%.

Sostanze interferenti

I dati dello studio clinico sono stati valutati per comprendere l'effetto di farmaci potenzialmente interferenti sui valori PAU. I valori PAU al basale sono stati messi a confronto per pazienti con e senza la presenza dei seguenti farmaci, e non è stata osservata alcuna differenza: aspirina, ticlopidina, clopidogrel, eparina, warfarina, acetaminofene, FANS, bloccanti beta-adrenergici, antagonisti di Ca++, statine e nitrati.

Aspirina ed eparina sono state ulteriormente studiate perché comunemente cosomministrate con terapia GPIIb/IIIa. Concentrazioni variabili di entrambi i farmaci sono state valutate in studi in-vitro e non è stato osservato alcun effetto significativo sui valori PAU. Questi dati sono coerenti con quelli riportati da Coller utilizzando una precedente versione prototipo dell'analisi VerifyNow IIb/IIIa.[5]

Gli effetti di conte piastriniche, valori di ematocrito e concentrazioni di fibrinogeno sono stati studiati in due studi clinici. Le prestazioni dell'analisi non sono state influenzate da valori di conte piastriniche comprese tra 98.000 e 376.000 piastrine per microlitro né da valori di ematocrito compresi fra il 23 e il 45%. Non è stata osservata alcuna interferenza quando i campioni con livelli di fibrinogeno tra 104 e 617 mg/dl sono stati analizzati con l'analisi VerifyNow IIb/IIIa. Una lipemia moderata è stata trovata responsabile di un aumento nei valori PAU pari al 16%.

Un altro inibitore GPIIb/IIIa intravenoso, tirofiban (Aggrastat®), è stato approvato per l'uso in pazienti con angina instabile. I pazienti trattati con tirofiban potrebbero essere inviati al laboratorio di cateterismo cardiaco per un intervento coronarico percutaneo (PCI). L'analisi VerifyNow IIb/IIIa potrebbe rilevare un'inibizione piastrinica indotta da tale farmaco; pertanto i risultati dell'analisi VerifyNow IIb/IIIa per questi pazienti vanno interpretati con cautela. Se nei 10 giorni precedenti è stato somministrato un inibitore GPIIb/IIIa, non è possibile utilizzare un campione prelevato prima della somministrazione di abciximab (ReoPro®) o eptifibatide (Integrilin®) per stabilire un risultato "al basale" o non inibito.

VerifyNow® IIb/IIIa
THROMBOZYTENREAKTIVITÄTSTEST

Accu:metrics®

GEBRAUCHSANWEISUNG

Technischer Support
(USA) +1 858 643 1600
support@accumetrics.com

VERWENDUNGSZWECK

Der VerifyNow IIb/IIIa-Test ist ein semiquantitativer Vollblut-Thrombozytenfunktionstest zur Messung der Glycoprotein-(GP)-IIb/IIIa-Rezeptorblockade bei mit Abciximab oder Eptifibatid behandelten Patienten. Die VerifyNow IIb/IIIa-Testergebnisse müssen in Verbindung mit anderen klinischen Daten und Labordaten ausgewertet werden, die dem Kliniker zur Verfügung stehen.

In-vitro-Diagnostikum.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Das VerifyNow-System ist ein optisches Erfassungssystem auf Turbidimetriebasis, das die durch Thrombozyten induzierte Aggregation misst. Das System besteht aus einem Gerät, einer Einweg-Testkassette und Materialien für die Qualitätskontrolle. Die Testkassette ist in **Abbildung 1** dargestellt. Die Qualitätskontrollmaßnahmen umfassen eine gerätegestützte elektronische Qualitätskontrolle (EQC), zwei Levels Flüssigqualitätskontrollen (Wet Quality Controls, WQC), interne Qualitätskontrollen und Transportkontrollen. Das Gerät steuert die gesamte Testsequenzierung, die Temperaturregelung, das Mischen von Reagenz und Probe und die Durchführung von Selbstdiagnosen. Der Grad der Thrombozytenfunktion wird bestimmt und das Ergebnis wird angezeigt.

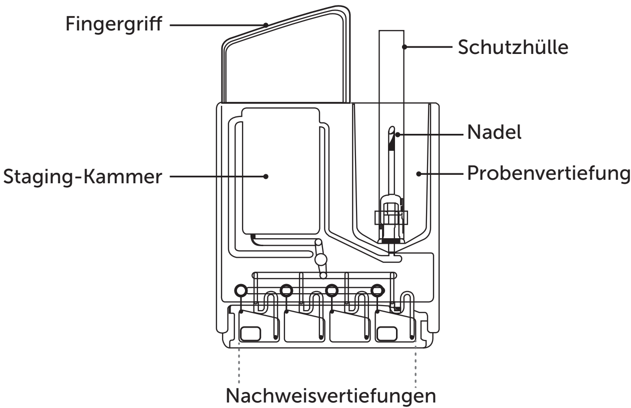


Abbildung 1: Testkassette

Die Testkassette enthält ein lyophilisiertes Präparat aus mit Human-Fibrinogen beschichteten Beads, Thrombinrezeptor aktivierendem Peptid (iso-TRAP) und Puffer. Bei der Patientenprobe handelt es sich um antikoaguliertes Vollblut, das vom Gerät automatisch aus dem Blutentnahmeröhrchen in die Testkassette dispensiert wird, wodurch eine Handhabung des Bluts durch den Benutzer entfällt.

TESTPRINZIP

Der VerifyNow IIb/IIIa-Test dient zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion anhand der Fibrinogenbindungsfähigkeit aktivierter Thrombozyten. Mit Fibrinogen beschichtete Mikropartikel aggregieren im Vollblut proportional zur Anzahl nicht blockierter Thrombozyten-GPIIb/IIIa-Rezeptoren. Die Microbead-Aggregationsrate ist schneller und reproduzierbarer, wenn Thrombozyten aktiviert werden; daher wird das Reagenz iso-TRAP in den Test integriert, um die Thrombozytenaktivierung ohne Fibrinbildung zu induzieren. Die Lichttransmission nimmt zu, wenn die aktivierten Thrombozyten fibrinogenbeschichtete Beads binden und aggregieren. Das Gerät misst diese Veränderung des optischen Signals und berichtet Ergebnisse in Thrombozytenaggregationseinheiten (Platelet Aggregation Units, PAU).

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum.

Das VerifyNow-Gerät und seine Komponenten dürfen nur in Übereinstimmung mit dem Benutzerhandbuch verwendet werden.

Die VerifyNow IIb/IIIa-Testkassette bzw. die Materialien für die Flüssigqualitätskontrolle (WQC) dürfen nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden.

Sämtliche Patientenproben sind als potenziell krankheitsübertragend zu behandeln.

Die Reagenzien werden mit einem aus Humanplasma aufgereinigten Material hergestellt, das mit negativem Ergebnis auf alle übertragbaren Krankheiten, einschließlich HIV-1, HIV-2, Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) und HCV getestet wurde. Die Testkassetten sind als biogefährliches Material zu handhaben und dementsprechend zu entsorgen.

Nach dem Aufsetzen des Blutentnahmeröhrchens (bzw. des WQC-Röhrchens) auf die Nadel in der Testkassette nicht mehr versuchen, das Röhrchen aus der Testkassette zu entfernen.

LAGERUNG UND HANDHABUNG DER REAGENZIEN

Temperaturanzeige des Testkassetten-Kits: Jedes VerifyNow-Testkit weist eine Temperaturanzeige außen an der Packung auf. Der Benutzer muss diese Anzeige bei Erhalt des Kits überprüfen. Hat sich die Farbe der Anzeige geändert, wurde das Kit einer erhöhten Temperatur ausgesetzt und eine Flüssigqualitätskontrolle (WQC) Level 2 muss analysiert werden, um eine korrekte Leistung der Reagenzien zu gewährleisten. Die Temperaturanzeige erfasst Fehler aufgrund widriger Umgebungsbedingungen.

Bei längerer Lagerung sind die Testkassetten auf 2 °C bis 8 °C zu halten. Alternativ können diese Testkassetten bis zu 8 Wochen lang bei Raumtemperatur (18 °C bis 25 °C) gelagert werden, jedoch nicht länger als bis zu dem auf dem Beutel aufgedruckten Verfallsdatum. Bei der Entnahme aus der Kühlung ist das Entsorgungsdatum auf die Beutel und/oder die Kit-Schachtel zu schreiben.

Die Testkassetten vor Gebrauch Raumtemperatur erreichen lassen.

Die Testkassetten müssen bis zum Gebrauch in den Folienbeuteln versiegelt bleiben, um Schäden durch Luftfeuchtigkeit zu vermeiden.

Die Testkassetten bleiben bis zu dem auf dem äußeren Karton aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

PROBENENTNAHMEVERFFAHREN

Anleitung zur Auswahl von Blutentnahmeröhrchen für alle Proben

Proben müssen gemäß nachstehender Tabelle in das jeweils geeignete Probenröhrchen mit Antikoagulans entnommen werden. Proben von mit Eptifibatid (Integrilin) behandelten Patienten dürfen nur in Röhrchen entnommen werden, die Lithium-Heparin enthalten.

Greiner 454322 (2-ml-Citratröhrchen)	Greiner 454323 (2-ml-Citratröhrchen für Höhenlagen)	Greiner 454244 (3-ml-Lithium-Heparin-Röhrchen)

Tabelle 1: Blutentnahmeröhrchen

Anleitung zur Probenentnahme aus Venen-Verweilkathetern:

Hinweis: Keine i.v.-Katheter verwenden.

1. Vollblutproben, die über einen Verweilkatheter entnommen werden, dürfen erst nach einer ausreichenden Ausschussentnahme (ca. 5 ml) zum Spülen der Leitung entnommen werden. Es ist sicherzustellen, dass der Verweilkatheter koagulatfrei ist. **Das Blut ist sofort nach der Entnahme in das Blutentnahmeröhrchen zu transferieren.**

Hinweis: Soll das Blut mit Hilfe einer Nadel transferiert werden, muss diese eine Größe von mindestens 21 G haben (bspw. 18–20 G).

2. Das Probenröhrchen vorsichtig **5 Mal** umdrehen, um die vollständige Vermischung des Inhalts sicherzustellen.
3. Die Probe innerhalb von 15 Minuten nach Entnahme gemäß den Anweisungen des Testverfahrens testen.
4. Beim Einführen eines i.v.-Katheters entnommenes Blut nicht verwenden.

Anleitung für peripher entnommene Blutproben:

1. Vollblut kann mit einer 21-G-Nadel oder einer größeren Nadel (z. B. 18–20 G) venös in ein geeignetes Blutentnahmeröhrchen entnommen werden. Blutproben sollten aus einer Extremität entnommen werden, die frei von periphervenösen Infusionen ist.
2. Zuerst ein Verwurfröhrchen (ca. 2 ml) entnehmen. Das Verwurfröhrchen darf kein EDTA enthalten.
3. Das Probenröhrchen vorsichtig mindestens 5 Mal umdrehen, um die vollständige Vermischung des Inhalts sicherzustellen.
4. Die Probe innerhalb von 15 Minuten nach Entnahme gemäß den Anweisungen des Testverfahrens testen.
5. Beim Einführen eines i.v.-Katheters entnommenes Blut nicht verwenden.

VORSICHTSMASSNAHMEN FÜR DIE PROBENENTNAHME

- Unsachgemäße Blutentnahmetechniken können zu einer Warnmeldung (Attention) führen. Bezüglich einer ausführlicheren Erläuterung dieser Meldung das Benutzerhandbuch des VerifyNow-Systems einsehen.
- Für Blutentnahme oder -transfer ausschließlich Nadelgrößen mit einem Kaliber von mindestens 21 G verwenden.
- Blutproben sollten vor dem Test aufrecht aufbewahrt werden und nicht über längere Zeit mit dem Gummistopfen des Blutentnahmeröhrchens in Kontakt kommen.
- Keinen Wippschüttler und kein pneumatisches Röhrchentransportsystem verwenden.
- Bei der Blutprobenentnahme muss sorgfältig vorgegangen werden, um eine Hämolyse oder Kontamination durch Gewebefaktoren zu vermeiden. Proben mit Anzeichen von Koagulation dürfen nicht verwendet werden.
- Das erste Entnahmeröhrchen ist zu verwerfen (ca. 2 ml).
- Wenn die Blutentnahme für ein großes Blutbild (CBC) zur gleichen Zeit wie die Probenentnahme für einen VerifyNow IIb/IIIa-Test erfolgt, ist die VerifyNow-Probe zuerst zu entnehmen. Das CBC-Röhrchen nach dem VerifyNow-Probenröhrchen füllen.
- Frische Vollblutproben sind innerhalb von 15 Minuten nach Entnahme zu verwenden.
- Es ist stets darauf zu achten, dass die Entnahmeröhrchen bis zur angegebenen Füllmenge gefüllt sind. In Höhen von mehr als 750 m über dem Meeresspiegel sind die Entnahmeröhrchen möglicherweise nicht bis zum spezifizierten Volumen gefüllt, was zu einem falschen Verhältnis von Blut und Antikoagulans führt. In diesen Höhenlagen muss der Benutzer die jeweiligen hausinternen Blutentnahmeprotokolle oder die Empfehlungen des Röhrchenherstellers für das ordnungsgemäße Befüllen der Blutentnahmeröhrchen befolgen.
- Proben nicht im Gefrier- oder Kühlschrank aufbewahren.
- Sämtliche Patientenproben sind als potenziell krankheitsübertragend zu behandeln.
- Die universellen Vorsichtsmaßnahmen sind zu befolgen.

TESTVERFAHREN

1. Den Typ der zu testenden Probe auswählen: VerifyNow WQC oder eine Patientenblutprobe.
2. Den Folienbeutel öffnen und die Testkassette entnehmen. Testkassetten dürfen nur am Fingergriff gehandhabt werden (**siehe Abbildung 1**).
3. Die Schutzhülle der Nadel entfernen (Hülle gerade nach oben abziehen). Die Hülle nicht drehen, da damit auch die Nadel entfernt werden könnte.
4. Bei Aufforderung durch das Gerät die Testkassette in das Gerät einsetzen.
5. Bei Aufforderung durch das Gerät das Probenröhrchen 5 Mal umdrehen und auf die Nadel in der Testkassette setzen. Die Abdeckung des Test-Schachts schließen.
6. Das Gerät führt den Test aus und zeigt das Ergebnis an.

 ACHTUNG	**Die Probe steht unter Druck. Das Probenröhrchen nicht von der Testkassette entfernen.**

7. Die Testkassette am Fingergriff gerade nach oben ziehen und entnehmen. Das Röhrchen nicht von der Testkassette entfernen. Die gesamte Testkassette/Probenröhrchen-Einheit in einen geeigneten Behälter für biogefährliche Abfälle entsorgen.

Die kompletten Gebrauchsanweisungen sind dem Benutzerhandbuch für das VerifyNow-System zu entnehmen.

IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

10 VerifyNow IIb/IIIa-Testkassetten (Katalog-Nr. 85310), einzeln in Folienbeuteln versiegelt. Jede Testeinheit enthält lyophilisierte, mit Fibrinogen beschichtete Beads, iso-TRAP, Rinderserumalbumin und Puffer.

ERFORDERLICHE, NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

- VerifyNow-System (Katalog-Nr. 86000)
- VerifyNow WQC-Kit (Katalog-Nr. 85047)
- In **Tabelle 1** aufgeführte Blutentnahmeröhrchen.

Hinweis: Bei der Messung von Proben mit Eptifibatid behandelter Patienten darf kein Natriumcitrat als Antikoagulans verwendet werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Elektronische Gerätekontrollen

- Zur Gewährleistung der ordnungsgemäßen Gerätefunktion empfiehlt der Hersteller, einmal pro Patiententesttag eine elektronische Qualitätskontrolle (EQC) zu analysieren. Diese wiederverwendbare Kassette überprüft die Optik, Pneumatik und Mischfunktion des Geräts. Bezüglich Anweisungen zur EQC-Analyse den Qualitätskontrollabschnitt des Benutzerhandbuchs für das VerifyNow-System einsehen.
- Das Gerät überprüft automatisch die Probenfüllung, den korrekten Flüssigkeitstransfer und das Mischen. Das Gerät überwacht außerdem die elektronischen und mechanischen Komponenten.

Testkassettenkontrollen

Der VerifyNow IIb/IIIa-Test umfasst die folgende interne Kontrolle:

- **Negative Kontrolle:** Jede Testkassette enthält interne Kontrollen, mit denen festgestellt wird, ob das Ergebnis des VerifyNow IIb/IIIa-Tests gültig ist, und die bei einem ungültigen Test die Ausgabe einer Fehlermeldung am Gerät bewirken. Der Test mit der negativen internen Kontrolle wird während der ersten fünf Sekunden des Assays durchgeführt, bevor die Thrombozytenaktivierung und die Bindung an die mit Fibrinogen beschichteten Beads erfolgt.

Flüssigqualitätskontrolle

VerifyNow WQC Level 1 und Level 2 sind in klinisch relevanten Konzentrationsstufen formuliert und können als Teil eines Labor-Qualitätskontrollprogramms verwendet werden. Die Akzeptanzbereiche für VerifyNow WQC Level 1 und Level 2 sind auf dem Beutel der Testkassette aufgedruckt.

Der Hersteller empfiehlt, die Level-2-WQC immer dann einmal durchzuführen, wenn eine neue Charge oder eine neue Lieferung von VerifyNow IIb/IIIa-Test-Kits in Empfang genommen wird. Die VerifyNow-WQC (Katalog-Nr. 85047) kann vom Hersteller bezogen werden. Bezüglich weiterer Informationen die WQC-Packungsbeilage einsehen.

Bei Fragen bezüglich WQC-Materialien bitte telefonisch mit dem Technischen Support von Accumetrics in Verbindung setzen.

FEHLERSUCHE UND -BEHEBUNG

Unter bestimmten Bedingungen kann das Gerät eine Fehler- oder Alarmmeldung anzeigen. Bezüglich einer ausführlicheren Erläuterung dieser Meldungen das Benutzerhandbuch des VerifyNow-Systems einsehen. Sind weitere Maßnahmen zur Fehlersuche und -behebung erforderlich, bitte an den Technischen Support von Accumetrics wenden:
(Rufnummer) +1 (858) 643-1600; (E-Mail) support@accumetrics.com.

KALIBRIERUNG

VerifyNow IIb/IIIa-Test Testkassetten sind ab Werk kalibriert. Diese Kalibrierungsdaten sind im Barcode jeder Testkassette enthalten und werden vom Gerät automatisch abgelesen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Der VerifyNow IIb/IIIa-Test berichtet Patientenergebnisse in Thrombozytenaggregationseinheiten (Platelet Aggregation Units, PAU), die als Funktion von Aggregationsrate und -umfang berechnet werden. Mit dem VerifyNow-Gerät kann außerdem die prozentuale Inhibierung für einen Patienten berechnet werden, vorausgesetzt, es wurde vor der Medikamentenverabreichung ein Baseline-PAU-Wert ermittelt. Der Einsatz von GPIIb/IIIa-Inhibitoren, wie z. B. Abciximab und Eptifibatid, hat sich als eine nützliche antithrombozytäre Strategie erwiesen.[1] Bei mit Abciximab oder Eptifibatid behandelten Patienten sowie in Tiermodellen von Koronarthrombose mit Abciximab wurde die Ex-vivo-Thrombozytenaggregationsreaktion praktisch aufgehoben, wenn eine GPIIb/IIIa-Blockade im Steady-State von >80 % aufrechterhalten wurde.[2,3] Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass bei allen GPIIb/IIIa-Inhibitoren, einschließlich Abciximab und Eptifibatid, eine Thrombozytenfunktionsinhibierung >95 % 10 Minuten nach Behandlungsbeginn mit einem erheblichen Rückgang der Inzidenz eines schwerwiegenden unerwünschten kardiovaskulären Ereignisses (MACE) verbunden war.[4]

Referenzbereiche

Der VerifyNow IIb/IIIa-Test wurde in klinischen Studien in 9 Prüfzentren an Patienten durchgeführt, die einem perkutanen Koronareingriff (PCI) unterzogen wurden. Die Tests wurden an Proben von 173 Patienten mit geplanter Abciximab-Behandlung (173 Baseline und 173 Post-Abciximab) und von 114 Patienten mit geplanter Eptifibatid-Behandlung (114 Baseline und 97 Post-Eptifibatid) durchgeführt. Aus **Tabelle 2** gehen die mittleren Baseline-PAU-Werte hervor (vor Verabreichung von Abciximab oder Eptifibatid), >80 % und >95 % Inhibierung.

	Abciximab			Eptifibatid		
PAU	**Baseline**	**≥80 %**	**≥95 %**	**Baseline**	**≥80 %**	**≥95 %**
n	173	173	130	114	97	50
Mittelwert	224	9	2	199	11	3
SA	54	20	4	40,6	9,4	3
Referenzbereich	125–330	0–44	0–13	136–288	0–31	0–10

Tabelle 2: Referenzbereiche

TESTGRENZEN

Eine verzögerte Testdurchführung oder Probleme mit der Probenentnahme können zu falschen Werte führen.

Das lyophilisierte Reagenz ist hygroskopisch und kann nach längerer Einwirkung von Raumluft an Qualität verlieren. Deshalb ist die Testkassette unmittelbar nach der Entnahme aus dem Folienbeutel zu verwenden.

Wenn die Ergebnisse außerhalb der erwarteten Grenzen liegen, muss die Möglichkeit einer unsachgemäßen Probenentnahme oder -handhabung geprüft werden. Den Test wiederholen. Dazu eine neue Testkassette und Probe verwenden. Der VerifyNow IIb/IIIa-Test wurde nicht bei Patienten mit erblich bedingten Thrombozytenstörungen, wie von-Willebrand-Faktor-Mangel, Glanzmann-Thrombasthenie und Bernard-Soulier-Syndrom, untersucht. Der VerifyNow IIb/IIIa-Test ist nicht zur Verwendung bei diesen Thrombozytenstörungen vorgesehen. Patienten mit Thrombozytenzahlen <100 x109/l in der Vorgeschichte wurden nicht untersucht. Der VerifyNow IIb/IIIa-Test ist nicht mit Thrombozyten-Aggregometrie bei Patienten mit 30-prozentigem Rückgang der Thrombozytenzahl im PRP verglichen worden. Die VerifyNow IIb/IIIa-Testergebnisse müssen in Verbindung mit anderen klinischen Daten und Labordaten ausgewertet werden, die dem Kliniker zur Verfügung stehen.

Die Referenzbereiche wurden auf der Grundlage von CLSI-Richtlinien berechnet. Folgende demografische Eigenschaften wurden berücksichtigt: Geschlecht, Ethnizität, gegenwärtiger Raucher und frühere Abciximab-Einnahme. Der mittlere Baseline-PAU war über alle Gruppen hinweg konsistent, und bei keinen der getesteten demografischen Variablen wurde ein statistisch signifikanter Bias nachgewiesen. Eine Analyse der klinischen Daten und der damit verbundenen demografischen Informationen ergab, dass eine Erstellung gesonderter Referenzbereiche auf der Grundlage demografischer Variablen nicht erforderlich war. Wie nachgewiesen wurde, gibt es keine Überlappung zwischen der Baseline und den Referenzbereichen für die Inhibierung, was dem Kliniker eine eindeutige Interpretation ermöglicht.

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

In Studien zur Beurteilung des VerifyNow IIb/IIIa-Tests für mit Abciximab behandelte Patienten wurde der VerifyNow IIb/IIIa-Test mit einem 125 I-Abciximab Rezeptorblockade-Test (Receptor Blockade Assay, RBA), der die pro Thrombozyt gebundenen Moleküle quantifiziert, sowie mit Thrombozyten-Aggregometrie unter Verwendung eines optischen CHRONO-LOG-Aggregometers mit 20 µM ADP als Agonist zur Ermittlung des maximalen Slope über einen Zeitraum von fünf Minuten, verglichen. Die Maßeinheit für den VerifyNow IIb/IIIa-Test ist PAU und basiert sowohl auf der Rate als auch auf dem Umfang der Bindung von Thrombozyten und mit Fibrinogen beschichteten Beads in einem festgelegten Zeitraum.

In Studien zur Beurteilung des VerifyNow IIb/IIIa-Tests bei mit Eptifibatid behandelten Patienten wurde der VerifyNow IIb/IIIa-Test mit demselben Thrombozyten-Aggregometrie-Test wie oben beschrieben sowie mit einem Thrombozyten-Durchflusszytometrie-Test gemessen in mittleren Fluoreszenzeinheiten verglichen.

Die klinischen Prüfungen sahen die Entnahme von Proben an drei Zeitpunkten vor: 1) Baseline, vor Verabreichung von Abciximab oder Eptifibatid; 2) während der Infusion, innerhalb einer Stunde nach Bolusverabreichung; und 3) nach der Infusion, 24 Stunden nach Bolusverabreichung oder zum Zeitpunkt der Entlassung, wobei der jeweils frühere Zeitpunkt gewählt wurde, um die Wiederherstellung der Thrombozytenfunktion zu beurteilen. Für jeden Patienten wurden eine Baseline-Probe, eine Probe während der Infusion und eine Probe nach der Infusion (24 Stunden) mit jeder Testmethode gemessen und die Ergebnisse aufgezeichnet.

Die **Abbildungen 2** und **3** zeigen den Zeitverlauf der Thrombozyteninhibierung für die drei Methoden als Einzelpunkte bzw. mittlere +/- Standardabweichung und veranschaulichen die Übereinstimmung der drei Methoden. (Siehe **Abbildungen 2** und **3**)

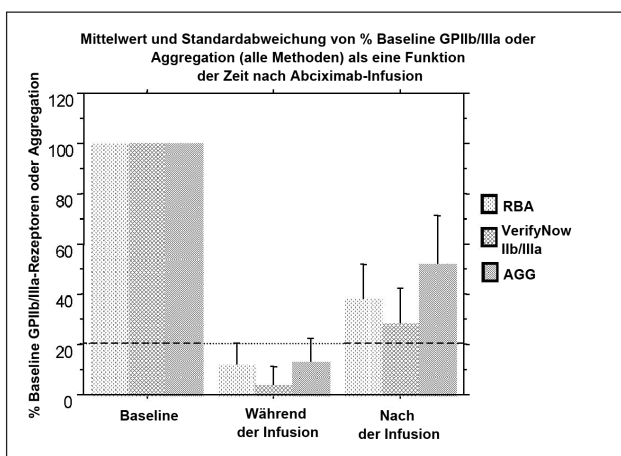


Abbildung 2: Mittelwert und Standardabweichung von % Baseline GPIIb/IIIa oder Aggregation (alle Methoden) als eine Funktion der Zeit nach Abciximab-Infusion

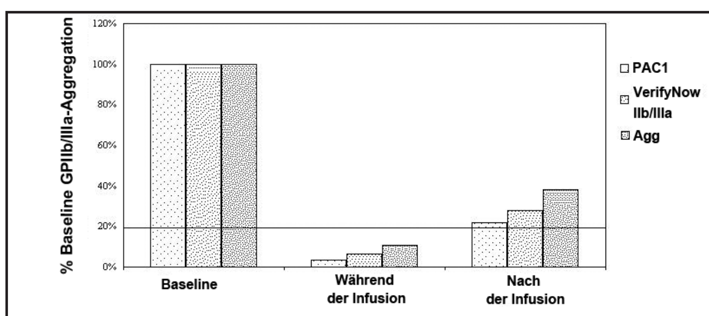


Abbildung 3: Mittelwert % Baseline GPIIb/IIIa-Aggregation (alle Methoden) als eine Funktion der Zeit nach Eptifibatid-Infusion

Methodenkorrelation

Die Methodenkorrelation wurde anhand einer Regressionsanalyse auf der Grundlage von Daten von mit Abciximab und Eptifibatid behandelten Patienten beurteilt. Die Daten wurden analysiert, um die Korrelation des VerifyNow IIb/IIIa-Tests mit RBA und Thrombozyten-Aggregometrie bei mit Abciximab behandelten Patienten und mit PAC1 Durchflusszytometrie und Thrombozyten-Aggregometrie bei mit Eptifibatid behandelten Patienten zu bestimmen. Die Datenpunkte für die klinische Analyse wurden für jeden Test in Roheinheiten berichtet: PAU für den VerifyNow IIb/IIIa-Test; Slope für Aggregometrie; Moleküle pro gebundenem Thrombozyt für RBA; und mittlere Fluoreszenz für PAC1 Durchflusszytrometrie. (Siehe **Abbildungen 4, 5, 6** und **7**)

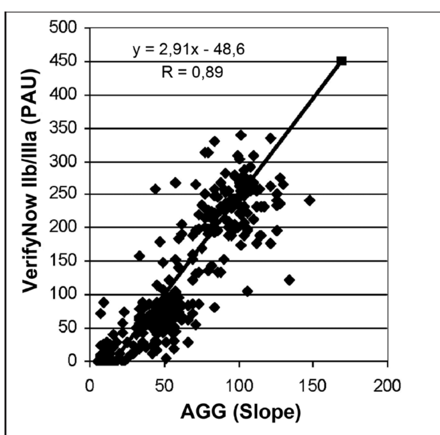


Abbildung 4: Deming-Regression VerifyNow IIb/IIIa-Test im Vergleich zur Aggregometrie

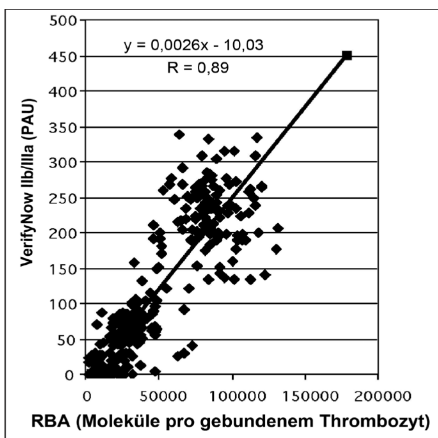


Abbildung 5: Deming-Regression VerifyNow IIb/IIIa-Test im Vergleich zur Rezeptorblockade

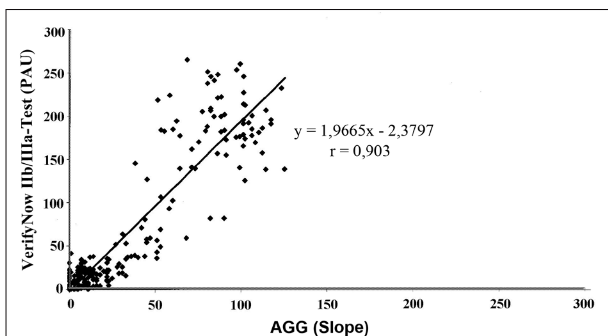


Abbildung 6: VerifyNow IIb/IIIa-Test im Vergleich zur Aggregometrie, Eptifibatid

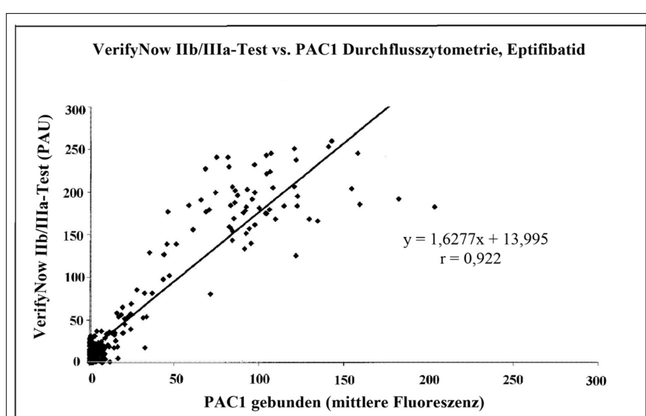


Abbildung 7: VerifyNow IIb/IIIa-Test vs. PAC1 Durchflusszytometrie, Eptifibatid

Analytische Sensitivität

Der VerifyNow IIb/IIIa-Test wurde an sechzehn mit Abciximab behandelten Patienten durchgeführt (n=6 pro Patient) und 10 Minuten nach Bolusgabe gemessen. Die ermittelte analytische Sensitivität des Tests betrug 8 PAU (2 X SA).

Linearität

Abbildung 8 zeigt die Linearität des VerifyNow-Systems. Die Tests bestanden aus mehreren Spendern mit Ex-vivo-Verabreichung von neun Eptifibatid-Konzentrationen über mehrere Tage hinweg und mit mehreren Replikaten. Die Linearitätsdaten zeigen, dass die Beziehung zwischen Eptifibatid-Konzentration und % Inhibierung nicht linear ist.

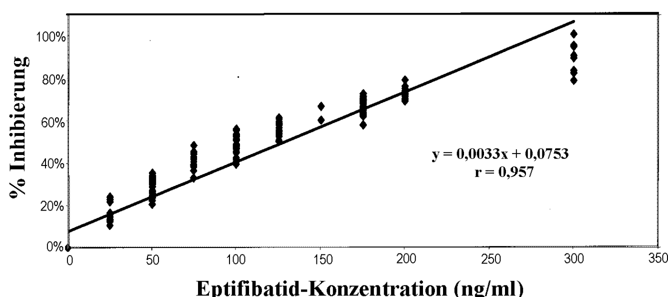


Abbildung 8: Linearität des VerifyNow- (Ultegra) Systems n=29, ex vivo dosiert, mehrtägig

Präzision

Die einfache und komplexe Präzision wurden sowohl für Abciximab als auch für Eptifibatid gemäß CLSI-Präzisionsrichtlinien anhand von drei Chargen VerifyNow IIb/IIIa-Testkassetten und zwei Geräten für Abciximab sowie zwei Chargen Testkassetten und drei Geräten für Eptifibatid berechnet. Freiwilligen Spendern wurden über 20 Tage hinweg Vollblutproben entnommen. Der in den **Tabellen 2** und **3** angegebene VK innerhalb der Analysenserie wird von CLSI als der Präzisionswert innerhalb der Analysenserie definiert. (Siehe **Tabellen 3** und **4**)

Komplexe Präzision, Vollblut				In der Analysenserie (einfach)		Gesamt	
Beschreibung	**n (Tage)**	**n (Ergebnisse)**	**Mittelwert**	**SA**	**VK %**	**SA**	**VK %**
Männlich, Alter 32	20	78	147,8	9,2	6,2	13,9	9,4
Männlich, Alter 28	20	77	185,3	12,2	6,6	16,0	8,6

Tabelle 3: Komplexe Präzisionsstatistik (Eptifibatid) gemäß CLSI-Definition

Komplexe Präzision, Vollblut				In der Analysenserie (einfach)		Gesamt	
Beschreibung	**n (Tage)**	**n (Ergebnisse)**	**Mittelwert**	**SA**	**VK %**	**SA**	**VK %**
Weiblich, Alter 26	20	80	186,3	9,8	5,2	18,7	9,9
Weiblich, Alter 41	20	80	187,0	9,1	4,9	26,1	13,9
Männlich, Alter 29	20	80	244,8	11,1	4,9	25,9	11,5

Tabelle 4: Komplexe Präzisionsstatistik (Abciximab) gemäß CLSI-Definition

Die einfache Präzision wurde mit der Flüssigqualitätskontrolle Level 2 des VerifyNow IIb/IIIa-Tests bestimmt. Drei Chargen Testkassetten wurden 20 Mal mit einer einzigen Kontrollcharge getestet. Diese Untersuchung wurde später mit einer neuen Kontrollcharge wiederholt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4** wiedergegeben. (Siehe **Tabelle 5**)

Kassettenvariation zwischen Chargen				
Kassettencharge	**n**	**PAU-Mittelwert**	**SA**	**VK***
1	20	202	12	6,0
2	20	180	15	8,3
3	20	176	17	9,9

Tabelle 5: Einfache Präzision

*Laut Herstellerspezifikation ist der Variationskoeffizient <10 %.

Störsubstanzen

Daten aus klinischen Studien wurden ausgewertet, um die Wirkung potenziell mit PAU-Werten interferierender Medikamente zu beurteilen. Baseline-PAU-Werte wurden für Patienten mit und ohne Vorliegen folgender Medikamente verglichen, und es zeigten sich keine Unterschiede: Aspirin, Ticlopidin, Clopidogrel, Heparin, Warfarin, Acetaminophen, NSAID, Beta-adrenerge Blocker, Ca++-Kanalblocker, Statine und Nitrate.

Aspirin und Heparin wurden weiter untersucht, weil sie häufig im Rahmen einer GP IIb/IIIa-Behandlung mitverabreicht werden. Verschiedene Konzentrationen beider Medikamente wurden in In-vitro-Studien beurteilt und keine signifikanten Auswirkungen auf PAU-Werte beobachtet. Diese Daten entsprechen denen, die von Coller anhand einer früheren Prototyp-Version des VerifyNow IIb/IIIa-Tests berichtet wurden.[5]

Die Auswirkung von Thrombozytenzahlen, Hämatokritwerten und Fibrinogen-Konzentrationen wurde in zwei klinischen Prüfungen untersucht. Bei Thrombozytenzahlwerten zwischen 98.000 und 376.000 Thrombozyten pro Mikroliter oder Hämatokritwerten zwischen 23 % und 45 % wurde die Testleistung nicht beeinträchtigt. Es wurde keine Testinterferenz beim Test von Proben mit Fibrinogenkonzentrationen im Bereich von 104 und 617 mg/dl mit dem VerifyNow IIb/IIIa-Test beobachtet. Es wurde festgestellt, dass eine moderate Lipämie einen Anstieg der PAU-Werte um 16 % bewirkt.

Ein weiterer intravenöser GP IIb/IIIa-Inhibitor, Tirofiban (Aggrastat®), ist für die Behandlung von Patienten mit instabiler Angina pectoris zugelassen. Patienten, die mit Tirofiban behandelt wurden, werden möglicherweise an das Herzkatheterlabor zur PCI überwiesen. Der VerifyNow IIb/IIIa-Test kann die Thrombozyteninhibierung durch dieses Medikament nachweisen; daher sind die VerifyNow IIb/IIIa-Testergebnisse für diese Patienten sorgfältig zu interpretieren. Eine vor Verabreichung von Abciximab (ReoPro®) oder Eptifibatid (Integrilin®) entnommene Probe kann nicht als „Baseline“ oder inhibierungsfreies Ergebnis verwendet werden, wenn in den 10 vorhergehenden Tagen ein GP IIb/IIIa-Inhibitor verabreicht wurde.

VerifyNow® IIb/IIIa

ANÁLISIS DE LA REACTIVIDAD PLAQUETARIA

Accumetrics®

INSTRUCCIONES DE USO

Asistencia técnica

(EE. UU.) +1 858 643 1600

support@accumetrics.com

INDICACIONES DE USO

La prueba de IIb/IIIa VerifyNow es una prueba funcional semicuantitativa de plaquetas en sangre entera utilizada para medir el bloqueo del receptor de las glucoproteínas (GP) IIb/IIIa en pacientes tratados con abciximab o eptifibatida. Los resultados de la prueba de IIb/IIIa VerifyNow deben interpretarse junto con los datos clínicos y analíticos de los que disponga el médico.

Para uso diagnóstico in vitro.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El sistema VerifyNow es un sistema de detección óptica basado en la turbidimetría que mide la agregación inducida por las plaquetas. El sistema consta de un instrumento, un dispositivo de prueba desechable y materiales de control de calidad. Consulte la **figura 1** para ver una representación del dispositivo de prueba. Entre las medidas de control de calidad están un control de calidad electrónico (EQC, Electronic Quality Control) basado en el instrumento, dos niveles de controles de calidad con reactivos (WQC, Wet Quality Control), controles de calidad internos y controles de uso durante el transporte. El instrumento gestiona toda la secuenciación de la prueba, controla la temperatura, realiza las mezclas reactivo-muestra y ejecuta autodiagnósticos. Se determina el grado de función plaquetaria y se muestra el resultado.

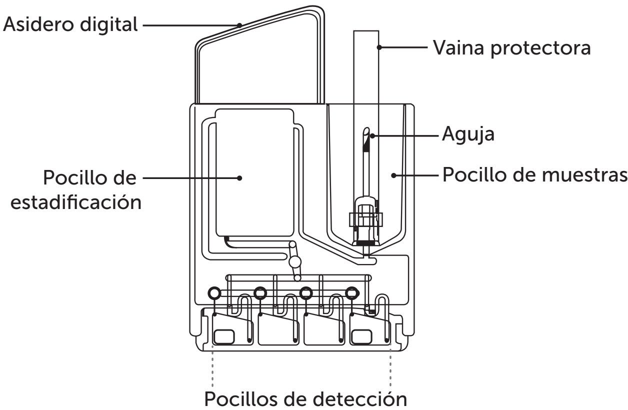


Figura 1: Dispositivo de prueba

Cada dispositivo de prueba de un solo uso contiene un preparado liofilizado de microesferas recubiertas con fibrinógeno humano, péptido activador del receptor de trombina (iso-TRAP) y tampón. La muestra del paciente es sangre completa anticoagulada, que el instrumento dispensa automáticamente desde el tubo de extracción al dispositivo de prueba, sin que sea necesario que el usuario manipule la sangre.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

La prueba de IIb/IIIa VerifyNow se ha diseñado para evaluar la función plaquetaria sobre la base de la capacidad de las plaquetas activadas para unirse al fibrinógeno. Las micropartículas recubiertas de fibrinógeno se agregan en sangre entera de forma proporcional al número de receptores GPIIb/IIIa plaquetarios no bloqueados. La tasa de agregación de las microesferas es más rápida y reproducible si las plaquetas están activadas; por tanto, se incorpora el reactivo iso-TRAP al canal de prueba para inducir la activación plaquetaria sin formación de fibrina. La transmitancia de la luz aumenta a medida que las plaquetas activadas unen y agregan las microesferas recubiertas de fibrinógeno. El instrumento mide este cambio de la señal óptica y comunica los resultados en unidades de agregación plaquetaria (PAU).

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico in vitro.

El instrumento VerifyNow y sus componentes sólo deben ser empleados como se indica en el Manual del usuario.

No utilice el dispositivo de prueba de IIb/IIIa VerifyNow ni los materiales de WQC pasada la fecha de caducidad.

Todas las muestras de pacientes deben manejarse como si fueran capaces de transmitir enfermedades.

Los reactivos se fabrican con un material purificado a partir de plasma humano que resultó negativo para todas las enfermedades transmisibles estudiadas, como VIH-1, VIH-2, antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y VHC. Maneje los dispositivos de prueba como si constituyeran un peligro biológico y elimínelos de forma adecuada.

No intente retirar el tubo de extracción de sangre (ni el WQC) del dispositivo de prueba después de insertarlo en la aguja del dispositivo de prueba.

CONSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN DE LOS REACTIVOS

Indicador del kit de dispositivos de prueba: cada kit para pruebas VerifyNow tiene un indicador de temperatura en el exterior del embalaje. Se instruye al usuario que inspeccione el indicador al recibir el kit. Si el indicador ha cambiado de color, significa que el kit ha estado expuesto a una temperatura elevada y se debe realizar un control de calidad con reactivos (WQC) de nivel 2 para asegurarse de que los reactivos estén en condiciones adecuadas. El indicador de temperatura detecta errores debidos a condiciones ambientales adversas.

Para un almacenamiento prolongado, manténganse los dispositivos de prueba a una temperatura de 2 a 8 °C. Como alternativa, los dispositivos de prueba pueden almacenarse hasta 8 semanas a temperatura ambiente (18 ° a 25 °C), pero nunca más allá de la fecha de caducidad impresa en la bolsa. Al retirarla de la refrigeración, escriba la fecha de eliminación en las bolsas y/o la caja del kit.

Deje que los dispositivos alcancen la temperatura ambiente antes de utilizarlos.

Los dispositivos de prueba deben permanecer precintados en las bolsas metalizadas hasta el momento en que se vayan a utilizar, para prevenir los daños causados por la humedad.

Los dispositivos de prueba son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la caja.

PROCEDIMIENTO PARA LA RECOGIDA DE MUESTRAS

Instrucciones para la selección de tubos de extracción de sangre para todas las muestras

Las muestras deben recogerse en el tubo de muestras con anticoagulante adecuado según la tabla siguiente. Las muestras extraídas de pacientes que estén recibiendo eptifibatida (Integrilin) solo deben recogerse en tubos que contengan heparina de litio.

Greiner 454322 (tubo de 2 ml con citrato)	Greiner 454323 (tubo de 2 ml con citrato para gran altitud)	Greiner 454244 (tubo de heparina de litio de 3 ml)

Tabla 1: Tubos de extracción de sangre

Instrucciones para la recogida de muestras de catéteres venosos permanentes:

Nota: No utilice un catéter intravenoso.

1. Las muestras de sangre completa obtenidas de un catéter permanente deben recogerse después de que se haya extraído suficiente sangre a desechar (aproximadamente 5 ml) para limpiar la vía. Compruebe que no haya coágulos en el catéter permanente. **Transfiera la sangre al tubo de recogida inmediatamente después de extraerla.**

Nota: Si hay que transferir sangre con una aguja, esta tiene que ser de calibre 21 o mayor (p. ej. de calibre 18-20).

2. Invierta suavemente el tubo de la muestra **5 veces** para garantizar el mezclado completo del contenido.
3. Analizar la muestra en el intervalo de 15 minutos desde su extracción como se indica en el procedimiento de análisis.
4. No se debe utilizar la sangre extraída durante la inserción de un catéter i.v.

Instrucciones para las muestras periféricas:

1. La sangre completa puede extraerse de lugares venosos con una aguja de calibre 21 o mayor (p. ej., de calibre 18 a 20) en un tubo de extracción adecuado. Las muestras de sangre deben extraerse de una extremidad que no sea objeto de infusiones venosas periféricas.
2. Llene primero un tubo de sangre a desechar (aproximadamente 2 ml). El tubo de sangre a desechar no debe contener EDTA.
3. Invierta suavemente el tubo de la muestra al menos 5 veces para garantizar el mezclado completo del contenido.
4. Analizar la muestra en el intervalo de 15 minutos desde su extracción como se indica en el procedimiento de análisis.
5. No se debe utilizar la sangre extraída durante la inserción de un catéter i.v.

PRECAUCIONES PARA LA RECOGIDA DE MUESTRAS

- El uso de técnicas inadecuadas de extracción de sangre podría provocar un mensaje de atención. Encontrará una explicación más detallada de este mensaje en el manual del usuario del sistema VerifyNow.
- Utilice solo agujas de calibre 21 o mayor para la extracción o transferencia de sangre.
- Las muestras de sangre deben conservarse en posición vertical antes de analizarlas y evitar el contacto prolongado con el tapón de goma del tubo de extracción de sangre.
- Evitar el uso de un oscilador o de un sistema neumático de transporte de tubos.
- La extracción de la muestra de sangre debe realizarse con cuidado para evitar la hemólisis o la contaminación por factores tisulares. No deben utilizarse muestras que tengan indicios de coágulos.
- El primer tubo de extracción se debe desechar (aproximadamente 2 ml).
- Si va a extraer sangre para un hemograma completo al mismo tiempo que toma la muestra para una prueba de IIb/IIIa VerifyNow, extraiga primero la muestra para VerifyNow. Llene el tubo para el hemograma después que el tubo de muestra para VerifyNow.
- Las muestras frescas de sangre completa deben utilizarse en el intervalo de 15 minutos desde su extracción.
- Compruebe siempre que los tubos de extracción de sangre estén llenos hasta los volúmenes indicados. A altitudes superiores a 750 metros sobre el nivel del mar, es posible que los tubos de recogida de sangre no se llenen hasta el volumen indicado; esto traería como consecuencia una proporción incorrecta de sangre a anticoagulante. Los usuarios que se encuentren a estas altitudes deben remitirse a los protocolos de extracción de sangre de sus instituciones o a las recomendaciones de llenado correcto del fabricante de los tubos de extracción.
- No congele ni refrigere las muestras de sangre.
- Todas las muestras de pacientes deben manejarse como si fueran capaces de transmitir enfermedades.
- Hay que adoptar las precauciones universales.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

1. Seleccione el tipo de muestra que se va a analizar: WQC de VerifyNow o una muestra de sangre de un paciente.
2. Abra la bolsa metalizada y extraiga el dispositivo de prueba. Los dispositivos de prueba solo deben sujetarse por su asidero digital (**consulte la figura 1**).

3. Retire la vaina protectora de la aguja tirando directamente de la vaina hacia arriba. No retuerza la vaina dado que podría provocar el desprendimiento de la aguja.
4. Cuando lo indique el instrumento, introduzca el dispositivo de prueba en el instrumento.
5. Cuando lo indique el instrumento, invierta el tubo de la muestra 5 veces e inserte el tubo en la aguja del dispositivo de prueba. Cierre la cubierta del puerto de prueba.
6. El instrumento ejecutará la prueba y mostrará el resultado.

	**La muestra está bajo presión. No extraiga el tubo de muestra del dispositivo de prueba.**

7. Retire el dispositivo de prueba del instrumento tirando de su empuñadura hacia arriba. No extraiga el tubo del dispositivo de prueba. Elimine el conjunto completo (dispositivo y tubo de muestra) en un recipiente adecuado para residuos biológicos peligrosos.

Encontrará las instrucciones completas de manejo en el manual del usuario del sistema VerifyNow.

MATERIALES INCLUIDOS

10 dispositivos de prueba de IIb/IIIa VerifyNow (n.º de catálogo 85310), precintados individualmente en bolsas metalizadas. Cada dispositivo de prueba contiene microesferas liofilizadas recubiertas de fibrinógeno, iso-TRAP, albúmina de suero bovino y tampón.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Sistema VerifyNow (n.º de catálogo 86000)
- Kit de WQC VerifyNow (n.º de catálogo 85047)
- Tubos de extracción de sangre enumerados en la **tabla 1**.

Nota: No debe usarse citrato de sodio como anticoagulante al medir muestras de pacientes tratados con eptifibatida.

CONTROL DE CALIDAD

Controles electrónicos del instrumento

- Para garantizar el funcionamiento del instrumento, el fabricante recomienda que se utilice un control de calidad electrónico (EQC) una vez cada día que se realicen análisis de pacientes. Este dispositivo reutilizable comprueba los componentes ópticos del instrumento, los elementos neumáticos y el mezclado. Consulte la sección de control de calidad del manual del usuario del sistema VerifyNow para recibir instrucciones sobre la utilización del EQC.
- El instrumento verifica automáticamente el llenado con las muestras, la transferencia correcta de líquidos y el mezclado. También revisa los componentes electrónicos y mecánicos.

Controles del dispositivo de prueba

La prueba de IIb/IIIa VerifyNow contiene el siguiente control interno:

- **Control negativo:** cada dispositivo de prueba tiene controles internos para determinar si el resultado de la prueba de IIb/IIIa VerifyNow es válido, y da lugar a que el instrumento comunique un mensaje de error para una prueba no válida. La prueba de control negativo interno se lleva a cabo durante los primeros cinco segundos del análisis, antes de que se produzca la activación de las plaquetas y su fijación a las microesferas recubiertas de fibrinógeno.

Control de calidad con reactivos

El Nivel 1 y el Nivel 2 del WQC de VerifyNow se formulan a niveles de pertinencia clínica y pueden usarse como parte de un programa de control de calidad de laboratorio. Los intervalos aceptables del nivel 1 y nivel 2 del WQC VerifyNow están impresos en la bolsa del dispositivo de prueba.

El fabricante recomienda que se ejecute un WQC de nivel 2 cada vez que se reciba un nuevo lote o un nuevo envío de kits de prueba de IIb/IIIa VerifyNow. El WQC VerifyNow (n.º de catálogo 85047) se puede obtener de su fabricante. Para obtener más información, consulte el prospecto del WQC.

Llame al servicio de Asistencia Técnica de Accumetrics para formular preguntas acerca de los materiales de WQC.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

En ciertas condiciones, el instrumento puede mostrar un mensaje de error o de alarma. Encontrará una explicación más detallada de estos mensajes en el manual del usuario del sistema VerifyNow. Para obtener ayuda con la resolución de problemas, póngase en contacto con el servicio de Asistencia Técnica de Accumetrics en:
(teléfono) +1 (858) 643-1600; (correo electrónico) support@accumetrics.com.

CALIBRACIÓN

Los dispositivos de prueba de IIb/IIIa VerifyNow vienen calibrados de fábrica. Esta información de calibración está incluida en el código de barras que lleva cada dispositivo de prueba y el instrumento la lee automáticamente.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La prueba de IIb/IIIa VerifyNow indica el resultado del paciente en unidades de agregación plaquetaria (PAU), que se calculan en función de la velocidad y el grado de agregación. El instrumento VerifyNow también permite al usuario calcular el porcentaje de inhibición de un paciente, siempre y cuando se haya obtenido un valor basal de PAU antes de la administración del fármaco. Se ha demostrado que el uso de inhibidores de GPIIb/IIIa tales como el abciximab y la eptifibatida es útil como estrategia antitrombótica[1]. En los pacientes a los que se administra abciximab o eptifibatida y en modelos animales de trombosis coronaria con abciximab, la respuesta de agregación plaquetaria ex vivo fue prácticamente anulada cuando el bloqueo de GPIIb/IIIa se mantenía en un nivel estable >80 %[2,3]. Estudios posteriores han revelado que, con todos los inhibidores de GPIIb/IIIa, incluidos el abciximab y la eptifibatida, la inhibición de la función plaquetaria >95 % a los 10 minutos posteriores al inicio del tratamiento estaba asociada a una reducción significativa de la incidencia de una complicación cardíaca grave[4].

Intervalos de referencia

La prueba de IIb/IIIa VerifyNow fue realizada en estudios clínicos en 9 centros con pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea. Se realizaron las pruebas en muestras de 173 pacientes que tenían previsto recibir tratamiento con abciximab (173 basales y 173 tras el abciximab) y 114 que tenían previsto recibir tratamiento con eptifibatida (114 basales y 97 tras la eptifibatida). La **tabla 2** presenta los valores medios basales de PAU (antes de la administración del abciximab o la eptifibatida), con inhibición de >80 % y >95 %.

	Abciximab			Eptifibatida		
PAU	**Valor basal**	**≥80 %**	**≥95 %**	**Valor basal**	**≥80 %**	**≥95 %**
n	173	173	130	114	97	50
Media	224	9	2	199	11	3
DE	54	20	4	40,6	9,4	3
Intervalo de referencia	125-330	0-44	0-13	136-288	0-31	0-10

Tabla 2: Intervalos de referencia

LIMITACIONES

Los retrasos en la realización de la prueba o las dificultades en la recogida de la muestra podrían ocasionar resultados falsos.

El reactivo liofilizado es higroscópico y puede deteriorarse ante la exposición prolongada al aire ambiental. Por tanto, el dispositivo de prueba debe utilizarse poco después de extraerlo de la bolsa metalizada.

Cuando los resultados no estén dentro de los límites esperados, debe investigarse la posibilidad de errores en la recogida o manipulación de la muestra. Repita la prueba con un nuevo dispositivo de prueba y una nueva muestra. No se ha estudiado con la prueba de IIb/IIIa VerifyNow a pacientes con trastorno hereditario de las plaquetas, como déficit del factor de von Willebrand, trombastenia de Glanzmann y síndrome de Bernard-Soulier. La prueba de IIb/IIIa VerifyNow no está indicada para emplearse con estos tipos de trastornos de las plaquetas. No se ha estudiado a pacientes que tengan antecedentes demostrados de recuentos plaquetarios <100 x 109/l. La prueba de IIb/IIIa VerifyNow no se ha comparado con la agregometría plaquetaria en pacientes con una reducción del 30 % en el recuento de plaquetas PRP. Los resultados de la prueba de IIb/IIIa VerifyNow deben interpretarse junto con los datos clínicos y analíticos de los que disponga el médico.

Se calcularon intervalos de referencia de conformidad con las directrices del CLSI. Se consideraron las siguientes características demográficas: sexo, origen étnico, uso actual de tabaco y uso anterior de abciximab. La PAU basal media era coherente en todos los grupos, sin que se demostraran alteraciones estadísticamente significativas en ninguna de las variables demográficas evaluadas. Un análisis de los datos clínicos y de la información demográfica asociada demostró que no existía la necesidad de crear intervalos de referencia separados a partir de las variables demográficas. Tal como se ha indicado, no existe solapamiento entre los intervalos de referencia basales y de inhibición, lo que aporta al facultativo una interpretación inequívoca.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Los estudios dedicados a evaluar la prueba de IIb/IIIa VerifyNow en pacientes tratados con abciximab compararon la prueba de IIb/IIIa VerifyNow con un ensayo de bloqueo de receptores (RBA) de 125 I-abciximab que cuantifica las moléculas unidas por cada plaqueta y la agregometría plaquetaria con un agregómetro óptico CHRONO-LOG con ADP 20 µM como agonista para detectar el gradiente máximo en un periodo de cinco minutos. La unidad de medida para la prueba de IIb/IIIa VerifyNow es la PAU y se basa tanto en la tasa como en el grado de plaquetas y microesferas recubiertas de fibrinógeno que se unen en un período definido.

Los estudios dedicados a evaluar la prueba de IIb/IIIa VerifyNow en pacientes tratados con eptifibatida compararon la prueba de IIb/IIIa VerifyNow con la misma prueba de agregometría descrita más arriba y con una prueba citométrica de flujo de plaquetas medida como unidades de fluorescencia media.

Los ensayos clínicos se diseñaron para obtener muestras en tres momentos: 1) Basal, antes de la administración del abciximab o la eptifibatida; 2) durante la infusión, durante la hora siguiente tras la administración del bolo y 3) tras la infusión, 24 horas tras la administración del bolo o en el momento del alta, lo que ocurriera primero, para evaluar la recuperación de la función plaquetaria. Para cada paciente se midió con cada método de prueba una muestra basal, otra durante la infusión y otra tras la infusión (24 horas), registrándose los resultados de cada paciente.

Las **figuras 2** y **3** muestran la cronología de la inhibición plaquetaria con los tres métodos, como puntos individuales y como media +/- desviación estándar respectivamente, para ilustrar la concordancia de los tres métodos (Consulte las **figuras 2** y **3**).

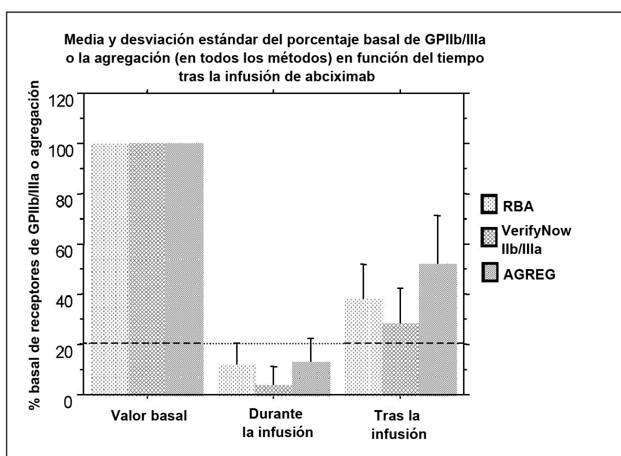


Figura 2: Media y desviación estándar del porcentaje basal de los receptores GPIIb/IIIa o la agregación (en todos los métodos) en función del tiempo tras la infusión de abciximab

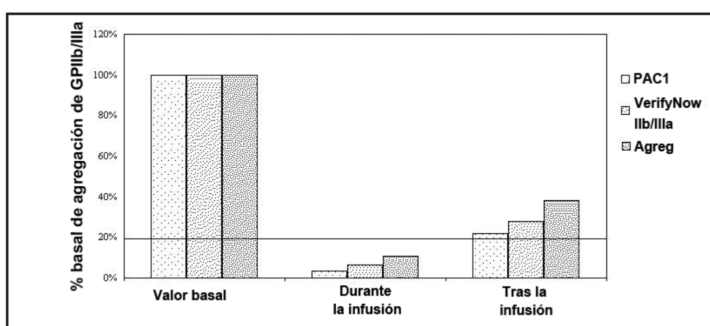


Figura 3: Media del porcentaje basal de agregación de GPIIb/IIIa (en todos los métodos) en función del tiempo tras la infusión de eptifibatida

Correlación de métodos

La correlación entre los métodos fue evaluada mediante un análisis de regresión basado en datos provenientes de pacientes tratados con abciximab y con eptifibatida. Se analizaron los datos para determinar la correlación de la prueba de IIb/IIIa VerifyNow mediante RBA y agregometría plaquetaria en los pacientes tratados con abciximab y mediante citometría de flujo PAC1 y agregometría plaquetaria en los pacientes tratados con eptifibatida. Los datos puntuales del análisis clínico se comunicaron en unidades en bruto para cada prueba: PAU para la prueba de IIb/IIIa VerifyNow; gradiente para la agregometría; moléculas por cada plaqueta unida en el caso de RBA y fluorescencia media en el caso de la citometría de flujo PAC1. (Consulte las **figuras 4, 5, 6** y **7**).

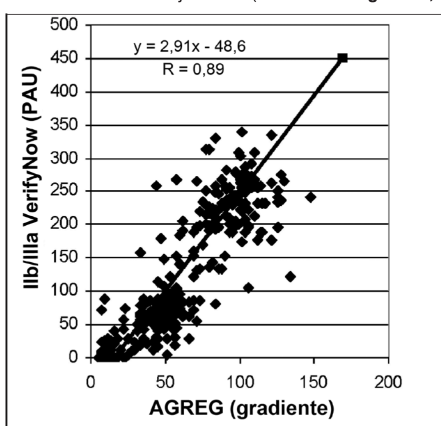


Figura 4: Regresión Deming de la prueba de IIb/IIIa VerifyNow frente a agregometría

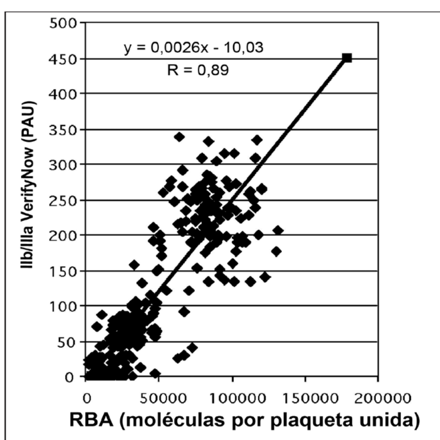


Figura 5: Regresión Deming de la prueba de IIb/IIIa VerifyNow frente a bloqueo de receptores

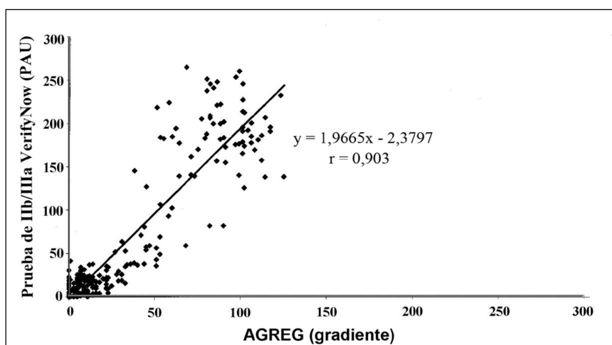


Figura 6: Prueba de IIb/IIIa VerifyNow frente a agregometría con eptifibatida

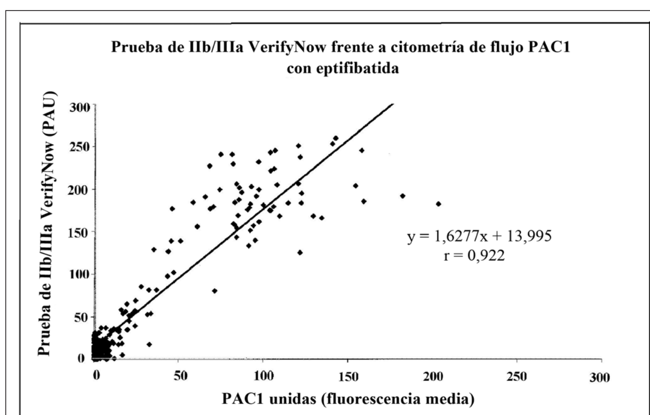


Figura 7: Prueba de IIb/IIIa VerifyNow frente a citometría de flujo PAC1 con eptifibatida

Sensibilidad analítica

La prueba de IIb/IIIa VerifyNow fue procesada (n = 6 por paciente) en dieciséis pacientes tratados con abciximab, midiéndose 10 minutos después de cada dosis de bolo. Se determinó que la sensibilidad analítica de la prueba era de 8 PAU (2 X DE).

Linealidad

La **figura 8** representa la linealidad del sistema VerifyNow. Las pruebas constaron de varios donantes *ex vivo* tratados con nueve concentraciones de eptifibatida durante varios días y con varias réplicas. Los datos de linealidad demuestran que la relación existente entre la concentración de eptifibatida y el % de inhibición no es lineal.

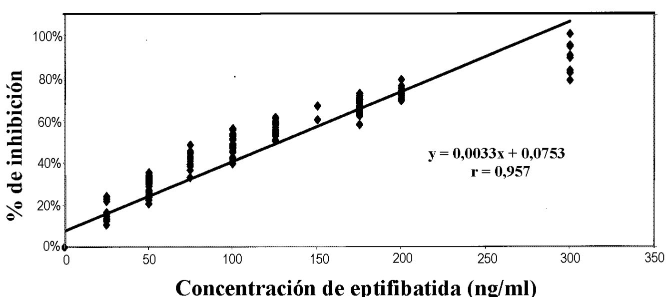


Figura 8: Linealidad del sistema VerifyNow n = 29, dosis ex vivo, en varios días

Precisión

La precisión simple y compleja tanto del abciximab como de la eptifibatida se calculó de conformidad con las directrices de precisión del CLSI, usando tres lotes de dispositivos de prueba de IIb/IIIa VerifyNow y dos instrumentos en el caso del abciximab, y dos lotes de dispositivos de prueba y tres instrumentos en el caso de la eptifibatida. Se extrajo sangre entera de donantes voluntarios durante un período de 20 días. El CV intraanálisis presentado en las **tablas 2** y **3** es definido por el CLSI como el valor de precisión intraanálisis (Consulte las **tablas 3** y **4**).

Precisión compleja para sangre entera				Intraserial (simple)		Total	
Descripción	**n (días)**	**n (resultados)**	**Media**	**DE**	**CV %**	**DE**	**CV %**
Varón de 32 años	20	78	147,8	9,2	6,2	13,9	9,4
Varón de 28 años	20	77	185,3	12,2	6,6	16,0	8,6

Tabla 3: Estadísticas de precisión compleja (eptifibatida) definidas por el CLSI

Precisión compleja para sangre entera				Intraserial (simple)		Total	
Descripción	**n (días)**	**n (resultados)**	**Media**	**DE**	**CV %**	**DE**	**CV %**
Mujer de 26 años	20	80	186,3	9,8	5,2	18,7	9,9
Mujer de 41 años	20	80	187,0	9,1	4,9	26,1	13,9
Varón de 29 años	20	80	244,8	11,1	4,9	25,9	11,5

Tabla 4: Estadísticas de precisión compleja (abciximab) definidas por el CLSI

La precisión simple fue determinada para el nivel 2 del control de calidad con reactivos de la prueba de IIb/IIIa VerifyNow. Se analizaron tres lotes de dispositivos de prueba 20 veces con un único lote de control. Este estudio fue repetido posteriormente con un nuevo lote de control. Los resultados se muestran en la **tabla 4** (consulte la **tabla 5**).

Variación de los cartuchos entre lotes

Lote de dispositivos	n	Media de PAU	DE	CV*
1	20	202	12	6,0
2	20	180	15	8,3
3	20	176	17	9,9

Tabla 5: Precisión simple

*La especificación del fabricante para el coeficiente de variación es <10 %.

Sustancias que producen interferencias

Se evaluaron los datos del ensayo clínico para valorar el efecto de los medicamentos con posible interferencia en los valores de PAU. Se compararon los valores de PAU basales de los pacientes con y sin presencia de los siguientes medicamentos, no observándose ninguna diferencia: aspirina, ticlopidina, clopidogrel, heparina, warfarina, paracetamol, AINE, betabloqueantes, antagonistas de los canales de Ca++, estatinas y nitratos.

La aspirina y la heparina fueron objeto de un estudio adicional dado que es común su coadministración con los tratamientos de GP IIb/IIIa. Se evaluaron distintas concentraciones de ambos fármacos mediante estudios in vitro, sin observarse ningún efecto significativo en los valores de PAU. Estos datos concuerdan con los datos comunicados por Coller con una versión de prototipo anterior de la prueba de IIb/IIIa VerifyNow[5].

El efecto de los recuentos de plaquetas, los valores de hematocrito y la concentración de fibrinógeno se estudió en dos ensayos clínicos. El rendimiento de la prueba no se vio afectado por los valores de recuento de plaquetas de entre 98.000 y 376.000 plaquetas por microlitro ni por los valores de hematocrito entre el 23 y el 45 %. No se observó interferencia en el rendimiento de la prueba de IIb/IIIa VerifyNow cuando se analizaron muestras con niveles de fibrinógeno de entre 104 y 617 mg/dl. Se observó que una lipemia moderada inducía un incremento del 16 % en los valores de PAU.

Otro inhibidor intravenoso de GP IIb/IIIa, el tirofiban (Agrastat®) está aprobado para su uso en pacientes con angina de pecho inestable. Los pacientes tratados con tirofiban pueden ser enviados al laboratorio de cateterización cardíaca para ICP. La prueba de IIb/IIIa VerifyNow permite detectar la inhibición plaquetaria por este fármaco; por tanto, los resultados de la prueba de IIb/IIIa VerifyNow para estos pacientes deben interpretarse con precaución. Las muestras tomadas antes de la administración del abciximab (ReoPro®) o la eptifibatida (Integrilin®) no se pueden usar para establecer un nivel basal o un resultado no inhibido si se ha administrado un inhibidor de GP IIb/IIIa en los 10 días anteriores.

BIBLIOGRAPHY

1. Coller BS. Blockade of Platelet GPIIb/IIIa Receptors as an Antithrombotic Strategy. Circulation. 1995; 92:2373-2379.

2. Mascelli MA, Worley S, Veriabo NJ, Lance ET, Mack S, Schaible T, Weisman JF, Jordan RE. Rapid Assessment of Platelet Function With a Modified Whole-Blood Aggregometer in Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty Patients Receiving Anti-GPIIb/IIIa Therapy. Circulation. 1997; 96:3860-3866.

3. Tcheng JE, Talley JD, O'Shea JC, Gilchrist IC, Kleiman NS, Grines CL, Davidson CJ, Lincoff AM, Califf RM, Jennings LK, Kitt MM, Lorenz TJ. Clinical Pharmacology of Higher Dose Eptifibatide in Percutaneous Coronary Intervention (The PRIDE Study). The American Journal of Cardiology. 2001;88: 1097-1102.

4. Steinhubl SR, Talley JD, Braden GA, Tcheng JE, Casterella PJ, Moliterno DJ, Navetta FI, Berger PB, Popma JJ, Dangas G, Gallo R, Sane DC, Saucedo JF, Jia G, Lincoff MA, Theroux P, Holmes DR, Teirstein PS, Kereiakes DJ. Pointof-Care Measured Platelet Inhibition Correlates With a Reduced Risk of an Adverse Cardiac Event After Percutaneous Coronary Intervention: Results of the GOLD (AU-Assessing Ultegra) Multicenter Study. Circulation. 2001;103:2572-2578.

5. Coller BS, Lang D, Scudder LE. Rapid and Simple Platelet Function Assay to Assess Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Blockade. Circulation. 1997; 95:860- 867.

6. Kini AS, Richard M, Suleman J, Perez N, Lee P, Fisher EA, Kamran M, Marmur JD, Sharma SK, Effectiveness of Tirofiban, Eptifibatide, and Abciximab in Minimizing Myocardial Necrosis During Percutaneous Coronary Intervention (TEAM Pilot Study). The American Journal of Cardiology. 2002;90:526-529.

7. Phillips DR, Teng W, Arfsten A, Nannizzi-Alaimo L, White M, Longhurst C, Shattil S, Randolf A, Jakubowski J, Jennings L, Scarborough R. Effects of Ca2+ on GPIIb/IIIa Interactions with Integrilin. Circulation. 1997;96: 1488- 1494.

EXPLANATION OF SYMBOLS / SYMBOLES / LEGENDA DEI SIMBOLI / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS

REF	Catalog Number Numéro de catalogue Numero di catalogo Katalognummer Número de catálogo
ORIGHUM	Origin-Human Origine : humaine Origine: umana Usprung: human Origen humano
IVD	In vitro Diagnostics Device Pour diagnostics in vitro Dispositivo diagnostico in vitro In-vitro-Diagnostikum Dispositivo diagnóstico in vitro
	Manufacturer Fabricant Produttore Hersteller Fabricante
	Temperature Limits Limites des températures Limiti di temperatura Temperaturbereich Límites de temperatura
	Use By Utiliser avant Da utilizzare entro Verfallsdatum Fecha de caducidad
EC REP	Authorized Representative in the European Community Représentant agréé au sein de la Communauté européenne Rappresentante autorizzato per l'Unione Europea Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft Representante autorizado en la Comunidad Europea
LOT	Lot Number Numéro de lot Numero di lotto Chargennummer Número de lote
Σ	Contains sufficient for < n > tests Possibilité de réaliser < n > tests Contiene materiale sufficiente per < n > analisi Ausreichend für < n > Tests Contiene cantidad suficiente para < n > pruebas
!	Caution, consult accompanying documents. Attention, consulter les documents joints Attenzione, consultare la documentazione allegata. Achtung, Begleitdokumente einsehen. Precaución, consultar la documentación adjunta.
i	Consult Instructions for Use Consulter le mode d'emploi Consultare le Istruzioni per l'uso Gebrauchsanweisung einsehen Consulte el modo de empleo



Accumetrics, Inc.

3985 Sorrento Valley Blvd.

San Diego, California 92121 U.S.A.

Telephone: +1 858 643 1600

Email address: support@accumetrics.com

Website: www.accumetrics.com





MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany

PN: 14452.D
(Catalog # 85310)

10/2013